



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

Efeito do Estradiol e do Desregulador Endócrino Bisfenol-A na Via do Paladar do Plexo Coroide

Maria Duarte Maltez

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Bioquímica

(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof. Doutora Isabel Gonçalves

Coorientadora: Mestre Joana Tomás

Covilhã, outubro de 2015

O conteúdo desta Dissertação é da exclusiva responsabilidade do autor.

(Maria Duarte Maltez)

Agradecimentos

Não posso deixar de agradecer a todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para me ajudar na realização deste trabalho, em especial:

À minha orientadora, a Professora Doutora Isabel Gonçalves, pela oportunidade de trabalhar com ela, pelo apoio, disponibilidade, orientação e conhecimentos transmitidos.

À Professora Doutora Cecília Santos, pela disponibilidade e partilha de conhecimentos.

À minha co-orientadora Mestre Joana Tomás por todos os conhecimentos teóricos e práticos transmitidos, pela inteira disponibilidade para me ensinar a trabalhar no laboratório e esclarecer todas as dúvidas, pela confiança que depositou em mim e pela amizade.

Às minhas colegas de laboratório, especialmente à Ana Raquel, Ana Catarina e Marya pelo apoio, ajuda e amizade. Obrigada por vos ter passado a ter como amigas e por terem tornado os dias de trabalho mais alegres.

À Margarida, Patrícia, Helena, Susana e Ângela com quem partilhei algumas dúvidas e se mostraram sempre disponíveis para me ajudar.

Às minhas amigas Su e Fabi, que estiveram sempre a meu lado e com quem partilhei todos os bons e maus momentos ao longo destes cinco anos académicos.

Aos meus amigos, que sempre me apoiaram e se preocuparam comigo. Obrigada Cláudia, Calisto, Paulo, Casaca, Gil, Falagueira, Diogo e Ricardo pela verdadeira amizade.

À Nina, a minha companheira de sempre, por me acalmar nos momentos de maior ansiedade e me dar muitos mimos.

Ao Bruno, por toda a amizade, apoio, carinho, mimos e paciência para me aturar nos momentos mais difíceis. Obrigada por me deixares partilhar tudo contigo e seres o meu aconchego.

À minha família por todo o apoio e motivação que me deu, especialmente ao meu irmão, às tias Madalena, Monique e Joaquina, à avó Beu e à Edite.

Aos meus pais, os mais importantes, por estarem sempre a meu lado, pela compreensão, conselhos, encorajamento que sempre me deram para nunca desistir e chegar até aqui e por todo o amor. Obrigada por serem meus amigos, o meu porto de abrigo, os melhores pais do Mundo.

Resumo

O plexo coroide (CP) é uma estrutura altamente vascularizada localizada nos ventrículos do cérebro, envolvida numa grande variedade de funções cruciais no sistema nervoso central (SNC), não sendo só responsável pela produção do líquido cefalorraquidiano (CSF) mas também pela vigilância da sua composição química. A via de transdução do paladar deteta alguns tipos de moléculas, avaliando deste modo a composição química de fluidos, não apenas na cavidade oral, mas também em tecidos extra-orais, tais como: trato respiratório, trato gastrointestinal, testículos, queratinócitos, rins, tiroide e cérebro. Numa análise de *microarrays* de cDNA, o nosso grupo de investigação descreveu recentemente o envolvimento das hormonas sexuais na regulação de diversas vias de sinalização no CP, nomeadamente na via de transdução de sinal do paladar. Os desreguladores endócrinos (DE) são compostos exógenos que estão disseminados no ambiente e influenciam a homeostasia, o desenvolvimento e a proliferação celular, mimetizando ou inibindo a ação das hormonas endógenas ou alterando a regulação do sistema endócrino, causando efeitos adversos para a saúde. No grupo dos DEs que são químicos sintéticos, o composto estrogénico bisfenol A (BPA) é um dos mais abundantes no meio ambiente. O objetivo do presente estudo é analisar o efeito do 17- β -estradiol (E2) na expressão dos genes envolvidos na via de transdução do paladar *ex vivo* e *in vivo*, bem como o efeito do BPA nesta via de sinalização. Nos estudos *ex vivo* utilizaram-se CPs de ratos *Wistar Han* recém-nascidos e foram aplicados estímulos de: i) E2 (0.1, 1, 10 e 100 nM) durante 6 horas, com e sem um pré-tratamento de 90 minutos com *fulvestrant* (ICI; 100 nM), um antagonista dos recetores de estrogénio (ERs); ii) BPA (10, 25, 50, 75 e 100 nM) durante 6 horas. O estudo *in vivo* foi efetuado em ratos *Wistar Han* fêmeas ovariectomizadas (OVX) com dois meses de idade. O efeito do E2 e do BPA nos níveis de mRNA foi analisado por PCR em tempo real do produto da transcrição reversa (RT-qPCR). Os ensaios *ex vivo* revelaram que o E2 regula negativamente a expressão de todos os genes analisados e, corroborando estes resultados, os testes *in vivo* mostraram que existe um aumento da expressão de todos os genes em ratos OVX em comparação com o controlo. No seu conjunto, os nossos resultados comprovam o estudo prévio de *microarrays* transcritómicos, de que a via do paladar é regulada por hormonas sexuais, e esclarecem o mecanismo molecular envolvido, onde, o pré-tratamento com ICI bloqueia o efeito do E2, indicando o envolvimento dos ERs. Por outro lado, os resultados do efeito do BPA mostram que este DE afeta a expressão dos genes da via de sinalização do paladar, revelando uma curva de expressão génica dose-resposta não monotónica. Os resultados deste estudo sugerem que a via de transdução do paladar no CP é regulada não só por hormonas endógenas mas também por compostos exógenos, tais como o BPA. Assim, podemos afirmar que o *background* hormonal e a exposição ambiental ao BPA parecem interferir na expressão dos componentes da via do paladar no CP, podendo afetar a vigilância química do CSF pelo CP, com possíveis consequências na homeostasia do SNC.

Palavras-Chave

Plexo Coroide, Via do Paladar, 17- β -Estradiol, Bisfenol A

Abstract

The choroid plexus (CP) is a highly vascularized structure located in the brain ventricles, involved in a wide variety of crucial functions in the central nervous system (SNC), being not only responsible for cerebrospinal fluid (CSF) production but also for the surveillance of its chemical composition. The taste transduction pathway detects some types of molecules, thereby evaluating the chemical content of fluids, not only in the oral cavity but also in extra-oral tissues, such as: respiratory tract, gastrointestinal tract, testis, keratinocytes, kidneys, thyroid and brain. In a cDNA microarray analysis, our research group recently described the involvement of sex hormones in the regulation of several signaling pathways in CP, namely the taste signal transduction pathway. Endocrine disrupters (DE) are exogenous compounds that are disseminated in the environment and influence homeostasis, development and cell proliferation, mimicking or inhibiting the action of endogenous hormones or altering the regulation of the endocrine system, causing adverse health effects. In the group of DEs that are synthetic chemicals, the estrogenic compound bisphenol A (BPA) is the most abundant in the environment. The aim of the present study is to analyze the effect of 17- β -estradiol (E2) on the expression of genes involved in the taste transduction pathway *ex vivo* and *in vivo*, as well as the effect of BPA in this signaling pathway. In *ex vivo* studies CPs of newborns *Wistar Han* rats were used and were applied stimuli of: i) E2 (0.1, 1, 10 and 100 nM) for 6 hours, with and without a pre-treatment of 90 minutes with fulvestrant (ICI; 100 nM), an antagonist of estrogen receptors (ERs); ii) BPA (10, 25, 50, 75 and 100 nM) for 6 hours. The *in vivo* study was carried out in ovariectomized (OVX) female *Wistar Han* rats with two months of age. The effect of E2 and BPA in mRNA levels was analyzed by real time PCR of the reverse transcription product (RT-qPCR). The *ex vivo* assays revealed that E2 negatively regulates the expression of all genes analyzed and, corroborating these results, the *in vivo* tests showed that there is an increase of the expression of all genes in OVX rats compared to controls. Taken together, our results prove the previous study of transcriptomic microarrays, that the taste pathway is regulated by sex hormones, and clarify the molecular mechanism involved, where the pre-treatment with ICI blocks the E2 effect, indicating the involvement of the ERs. On the other hand, the results of BPA effect show that this DE affects the expression of taste signaling pathway genes, revealing a non-monotonic dose response curve of gene expression. The results of this study suggest that the taste transduction pathway in CP is regulated not only by endogenous hormones but also by exogenous compounds, such as BPA. Thus, we can affirm that the hormonal background and the environmental exposure to BPA seem to interfere with the expression of the taste pathway components in CP, which may affect the chemical surveillance of the CSF by CP, with possible consequences on SNC homeostasis.

Keywords

Choroid plexus, Taste Pathway, 17- β -Estradiol, Bisphenol A

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	vi
Índice	vii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas e Acrónimos	xi
I. Introdução	1
1. Plexo Coroide	2
1.1. Estrutura e Morfologia do Plexo Coroide	2
1.2. Funções Biológicas	3
1.2.1. Produção e Secreção do Líquido Cefalorraquidiano.....	3
1.2.2. Síntese e Secreção de Outras Substâncias.....	5
1.2.3. Proteção	5
2. O Paladar	6
2.1. A via de sinalização do paladar.....	6
2.1.1. Os estímulos Doce, Amargo e <i>Umami</i>	6
2.1.2. Os estímulos Ácido e Salgado.....	8
2.2. A via de sinalização do paladar noutros tecidos.....	9
3. Hormonas Esteroides	12
3.1. Síntese de estrogénios	12
3.2. Mecanismo de ação dos estrogénios	13
3.3. As hormonas esteroides e o plexo coroide	15
4. Desreguladores Endócrinos.....	15
4.1. Bisfenol A.....	16
4.1.1. Mecanismo Molecular de Ação do BPA.....	16
4.1.2. Exposição ao BPA	17
II. Objetivo	19

III. Material e Métodos	21
1. Experimentação animal.....	22
1.1. Animais	22
1.1.1. Estudos <i>ex vivo</i>	22
1.1.1.1. Estímulos.....	22
1.1.2. Estudos <i>in vivo</i>	23
2. RNA total	24
2.1. Extração de RNA total.....	24
2.2. Determinação da integridade do RNA total	24
2.3. Quantificação do RNA total	25
3. Síntese de DNA complementar	25
4. Amplificação enzimática de DNA.....	26
5. PCR em Tempo Real da transcrição reversa	27
6. Análise Estatística	27
IV. Resultados	28
1. Expressão dos genes da via de sinalização do paladar no plexo coroide de rato.....	29
1.1. Amplificação enzimática da transcrição reversa (RT-PCR)	29
2. Efeito do E2 e do BPA na expressão dos genes da via de transdução do paladar	31
2.1. Otimização das condições de PCR em tempo real do produto da transcrição reversa (RT-qPCR)	31
2.2. Efeito do E2 na via de transdução do paladar	32
2.3. Efeito do BPA na via de transdução do paladar	36
V. Discussão	37
VI. Conclusão e Perspetivas Futuras	41
VII. Referências Bibliográficas	43

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação morfológica do plexo coroide	2
Figura 2 - Secreção do CSF.	4
Figura 3 - Transdução de sinal dos sabores doce, amargo e <i>umami</i>	7
Figura 4 - Transdução de sinal dos sabores salgado e ácido	9
Figura 5 - Mecanismos de ação dos estrogénios	14
Figura 6 - Esquema dos ensaios experimentais realizados	23
Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose a 2% corada com <i>GreenSafe</i> de 10 µL de cada um dos produtos de PCR, realizado com cDNA de CP, e <i>primers</i> específicos dos genes da via de sinalização do paladar	30
Figura 8 - Retas log [cDNA] vs. Ct para o cálculo de eficiência de reação de RT-qPCR (método série de diluição) dos genes em estudo.....	32
Figura 9 - Efeito dos veículos (0.002% DMSO e 0.002% EtOH) na expressão dos genes da via de transdução do paladar, em CP de ratos <i>Wistar Han</i> recém-nascidos	32
Figura 10 - Efeitos do E2 sobre os níveis de expressão dos genes da via de sinalização do paladar	33
Figura 11 - Ensaios com ICI para esclarecimento do mecanismo molecular de atuação do E2 sobre os níveis de expressão dos genes da via de sinalização do paladar	34
Figura 12 - Análise dos níveis de expressão do mRNA, por RT-qPCR, dos genes da via de sinalização do paladar, no CP de ratos fêmea <i>Wistar Han</i> com 2 meses de idade <i>Sham</i> (controle) e OVX	35
Figura 13 - Efeito do veículo (1% DMSO), nos níveis de expressão do <i>Tas1R1</i> e <i>TrpM5</i> , em CP de ratos <i>Wistar Han</i> recém-nascidos	36
Figura 14 - Efeitos do BPA sobre os níveis de expressão dos genes da via de sinalização do paladar.....	36

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Sequências dos *primers* e condições de amplificação dos genes utilizados neste estudo..... 26

Tabela 2 - Comparação dos resultados da expressão relativa dos estudos de *microarrays* transcritômicos e do RT-qPCR para os genes da via de sinalização do paladar no CP de ratos OVX, quando comparados com os de ratos *Sham* 35

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

AC	Adenilato-ciclase
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> (Monofosfato de adenosina cíclico)
AP-1	Proteína ativadora 1
ASICs	Canais iónicos de deteção de ácido
ATP	Adenosina trifosfato
ATPases	Proteínas integrais da membrana
BPA	Bisfenol A
Ca ²⁺	ião Cálcio
[Ca ²⁺] _i	Concentração de cálcio intracelular
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (DNA complementar)
CIC-4a	Canal de Cl ⁻
Cl ⁻	ião Cloro
CP	<i>Choroid Plexus</i> (Plexo coroide)
CPEC	<i>Choroid Plexus Epithelial Cells</i> (Células epiteliais do plexo coroide)
CSF	<i>Cerebrospinal Fluid</i> (Líquido cefalorraquidiano)
CYPs	Enzimas do citocromo P450
DAG	Diacilglicerol
DE	Desreguladores endócrinos
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHEA	Desidroepiandrosterona
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium - high glucose</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Desoxirribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP's	Desoxinucleotídeos trifosfato
E1	Estrona
E2	17-β-estradiol
E3	Estriol
ENaC	Canais de Na ⁺ sensíveis à amilorida
ERE	Elementos responsivos ao estrogénio
ERs	<i>Estrogen Receptors</i> (Recetores de estrogénio)
ERα	Isoforma α do recetor de estrogénio
ERβ	Isoforma β do recetor de estrogénio
EtOH	Etanol
FBS	Soro fetal bovino
GLP-1	Péptido tipo glucagon 1
GPCRs	<i>G protein-coupled receptors</i> (Recetores acoplados à proteína G)
GPERs	Recetores de estrogénio acoplados à proteína G
GPR30	Recetor de estrogénio 30 acoplado à proteína G
H ⁺	Protão
HCNs	Canais de K ⁺ operados por nucleótidos cíclicos ativados por hiperpolarização

Efeito do Estradiol e do Desregulador Endócrino Bisfenol-A na Via do Paladar do Plexo Coroide

HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
HSDs	Enzimas hidroxisteroides desidrogenases
Hsp90	<i>Heat shock protein 90</i>
ICI	<i>Fulvestrant</i>
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
IP ₃ R3	Recetor inositol-1,4,5-trifosfato tipo 3
K ⁺	ião Potássio
MAPK	Proteína cinase ativada por mitogénio
Mg ²⁺	ião Magnésio
Na ⁺	ião Sódio
NPPB	Canais de Cl ⁻ sensíveis ao 5-nitro-2-(3-fenilpropilamina)-ácido Benzóico
OOX	<i>Orchidectomized</i> (Orquidectomizados)
OVX	<i>Ovariectomized</i> (Ovariectomizadas)
p23	Proteína <i>cochaperone</i> para a Hsp90
PDE	Fosfodiesterases
pH	Potencial de hidrogénio
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA	Proteína Cinase A
PKD1L3-PKD2L1	Heterodímero 1L3 e 2L1 da doença renal policística 1
PLCB2	Fosfolipase C B2
PVC	Cloreto de polivinilo
PYY	Péptido YY
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucleico)
RNases	Ribonucleases
RT-PCR	<i>Reverse transcription Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia de polimerase da transcrição reversa)
RT-qPCR	PCR em tempo real do produto da transcrição reversa
<i>Sham</i>	Controlo
siRNA	Pequeno RNA de interferência
SNC	Sistema nervoso central
Sp1	Proteína de especificidade 1
TrpM5	Canal iónico recetor de potencial transitório M5
TTR	Proteína plasmática humana tetramérica transtirretina

I. Introdução

1. Plexo Coroide

No interior do encéfalo localiza-se o sistema ventricular cerebral constituído por quatro cavidades interligadas: dois ventrículos laterais, o terceiro e o quarto ventrículos. Na parede de cada um destes ventrículos encontra-se o plexo coroide (CP), uma estrutura responsável pela produção do líquido cefalorraquidiano (CSF), que constitui uma interface entre o sangue periférico e o CSF (barreira sangue-CSF) (Emerich et al., 2005, Johansson, 2014, Lehtinen et al., 2013, Wolburg and Paulus, 2010).

1.1. Estrutura e Morfologia do Plexo Coroide

O CP consiste numa estrutura convoluta de pequena dimensão, possuindo uma monocamada contínua de células epiteliais cuboides ciliadas [células epiteliais do plexo coroide (CPEC)], derivadas do revestimento endimário dos ventrículos (Figura 1) (Damkier et al., 2010, Damkier et al., 2013, Emerich et al., 2005, Skipor and Thiery, 2008). Nos ventrículos laterais do cérebro, o CP forma estruturas em forma de folha, enquanto que no terceiro e quarto ventrículos forma estruturas ramificadas, bastante lobuladas e possuindo numerosas vilosidades (Damkier et al., 2010, Skipor and Thiery, 2008, Wolburg and Paulus, 2010).

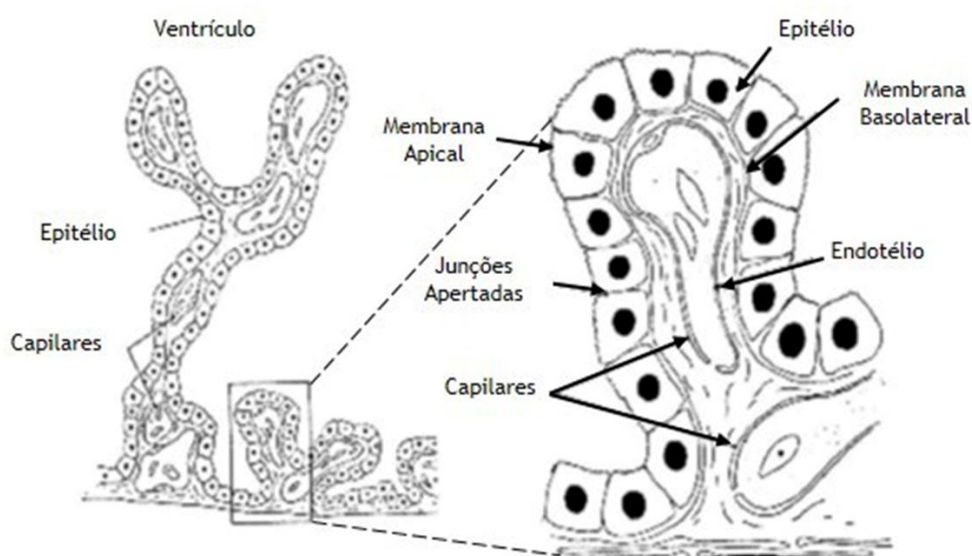


Figura 1 - Representação morfológica do plexo coroide. Cada plexo coroide possui uma estrutura ramificada constituída por uma monocamada de células epiteliais unidas por junções apertadas. A membrana apical destas células contém numerosas vilosidades e a membrana basolateral apresenta uma superfície lisa que permite o contacto com os capilares sanguíneos. Adaptado de (Brown et al., 2004).

As CPEC são suportadas pela lâmina basal, que delinea o estroma interno do tecido conjuntivo, extremamente vascularizado (Wolburg and Paulus, 2010). A membrana apical possui numerosas vilosidades que diferem em diâmetro e forma, e aumentam a área da superfície celular (Christensen et al., 2013, Emerich et al., 2005, Mortazavi et al., 2014). Enquanto a superfície apical contacta diretamente com o CSF, que preenche o interior dos ventrículos, a superfície basal, de aspeto liso, contacta com o estroma interno e os capilares sanguíneos sendo a responsável pelas trocas entre o sangue e o CP (Brown et al., 2004, Skipor and Thiery, 2008). Os capilares têm paredes endoteliais fenestradas de forma a garantir uma elevada permeabilidade (Wolburg and Paulus, 2010), permitindo que pequenas moléculas hidrófilas passem para o fluido intersticial (Mortazavi et al., 2014). Na superfície lateral das CPEC, existem desmossomas e junções apertadas que são importantes para a união destas células (Mortazavi et al., 2014). As junções apertadas formam a barreira sangue-CSF e permitem regular a passagem de moléculas entre o sangue e o CSF (Johansson et al., 2008, Johansson, 2014, Redzic and Segal, 2004).

Para além disto, intracelularmente, as CPEC contêm um grande núcleo central esférico e um citoplasma abundante com numerosas mitocôndrias, necessárias para manter as elevadas necessidades energéticas e metabólicas; aparelho de Golgi, retículo endoplasmático liso e vesículas lisossomais, o que demonstra a sua capacidade de síntese (Emerich et al., 2005, Mortazavi et al., 2014, Smith et al., 2004).

1.2. Funções Biológicas

O CP está envolvido numa grande variedade de funções cruciais para o sistema nervoso central (SNC), tais como: produção e secreção do CSF, síntese e secreção de substâncias biologicamente ativas e proteção e regulação do ambiente interno do cérebro através da barreira sangue-CSF. Muitas destas funções dependem, principalmente, das CPEC (Emerich et al., 2005, Johansson, 2014, Skipor and Thiery, 2008).

1.2.1. Produção e Secreção do Líquido Cefalorraquidiano

O CSF atua como tampão mecânico do cérebro, protegendo-o contra danos causados por impactos físicos, funciona como uma via de drenagem para o cérebro, em que produtos de metabolismo são removidos, bem como uma via de transporte de nutrientes para o SNC e também como uma via de comunicação dentro do SNC (Brown et al., 2004, Redzic and Segal, 2004).

No SNC adulto humano estima-se que o volume de CSF que circula seja cerca de 150 mL, e que o CSF se renove três a quatro vezes por dia, sugerindo uma produção diária de cerca de 400-600 mL de CSF (Lehtinen et al., 2013, Zappaterra and Lehtinen, 2012). Deste volume total que circula no sistema apenas 25% está localizado nos ventrículos, o restante preenche as cisternas basais, o espaço subaracnoide e flui em torno da medula espinal (Redzic and Segal, 2004, Skipor and Thiery, 2008). O CSF é um líquido claro, ligeiramente viscoso e com uma composição

diferente da do plasma sanguíneo. O seu pH é mais baixo do que o do plasma, assim como as concentrações de glicose, proteína, potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}) e bicarbonato (HCO_3^-). Em contraste, os níveis de sódio (Na^+), cloro (Cl^-) e magnésio (Mg^{2+}) são mais elevados, bem como os níveis de folato que são duas a três vezes maiores no CSF do que no plasma. A proteína tetramérica plasmática humana, transtirretina (TTR), representa 25% do total das proteínas do CSF (Emerich et al., 2005).

A secreção do CSF é uma das principais funções do CP. O CSF flui a partir dos ventrículos laterais para o terceiro ventrículo, através do forame de *Monro*, depois para o quarto ventrículo, através do aqueduto de *Sylvius* e, em seguida, para as cisternas basais e para o espaço subaracnoide por meio de aberturas localizadas abaixo do cerebelo, respetivamente forames de *Luschka* e de *Magendie* (Figura 2). O retorno à circulação periférica ocorre por reabsorção através das vilosidades aracnoides nos seios venosos do cérebro (Lehtinen et al., 2013, Skipor and Thiery, 2008).

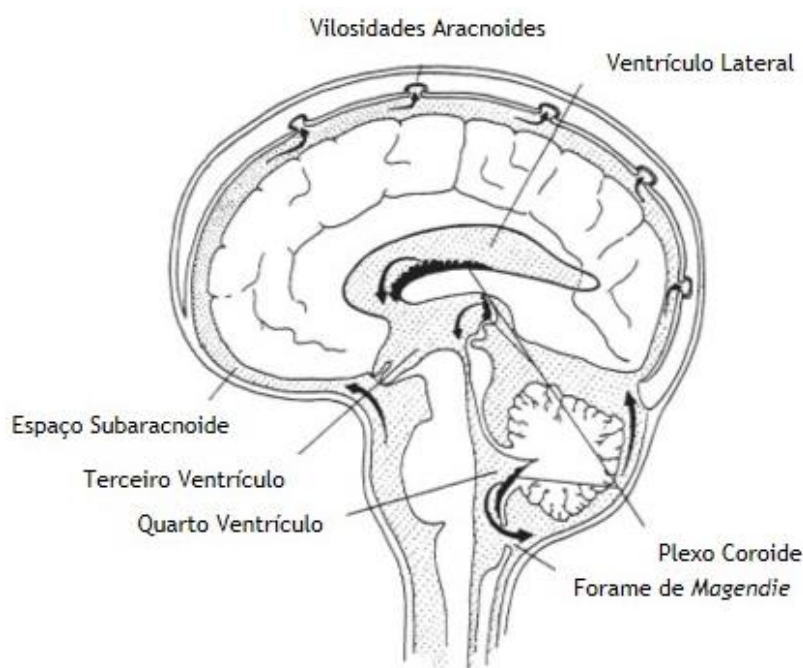


Figura 2 - Secreção do CSF. Cada hemisfério cerebral possui um ventrículo lateral a partir do qual o CSF flui para o terceiro ventrículo através do forame de *Monro* e de seguida para o quarto ventrículo através do aqueduto de *Sylvius*. Por fim o CSF flui para o espaço subaracnoide através de aberturas localizadas abaixo do cerebelo como o forame de *Magendie*. Adaptado de (Brown et al., 2004).

Para a secreção deste fluido, através da monocamada epitelial, é consumida energia na forma de adenosina trifosfato (ATP). ATPases, outro tipo de canais iónicos e aquaporinas, nas faces apical e basolateral das células epiteliais, medeiam o processo ativo de secreção. Este processo envolve o transporte unidirecional de Na^+ , Cl^- , e HCO_3^- do sangue para os ventrículos e de K^+ na direção oposta. O movimento de iões cria um gradiente osmótico que leva à secreção de moléculas de água para os ventrículos. O HCO_3^- pode também ser sintetizado nas células epiteliais através da enzima anidrase carbónica (Mortazavi et al., 2014).

1.2.2. Síntese e Secreção de Outras Substâncias

O CP tem uma boa localização para a distribuição de moléculas no cérebro. Possui numerosos sistemas de transporte específicos, contém uma grande variedade de receptores e é uma fonte importante de compostos biologicamente ativos, como hormonas, péptidos, citocinas e fatores de crescimento, que são responsáveis pelo desenvolvimento do SNC e pela manutenção da sua homeostasia (Chodobski and Szmydynger-Chodobska, 2001, Emerich et al., 2005, Redzic and Segal, 2004). Uma vez que os receptores para alguns destes polipéptidos estão localizados no CP, podem ocorrer sinalizações autócrinas e parácrinas no tecido coroide. Por outro lado, o CP pode promover efeitos do tipo endócrino, uma vez que os polipeptídeos sintetizados pelo epitélio coroide e libertados no CSF podem exercer efeitos distais sobre as células-alvo no cérebro devido ao grande fluxo deste fluido (Chodobski and Szmydynger-Chodobska, 2001).

1.2.3. Proteção

A barreira sangue-CSF, formada pelas CPEC e pelas junções apertadas, controla a difusão de moléculas entre o sangue e o CSF, sendo a sua integridade estrutural e funcional extremamente importante para a homeostasia do SNC. Além da sua contribuição mecânica para a barreira sangue-CSF, o CP está numa posição ideal para monitorizar o CSF para a presença de compostos nocivos e para a invasão celular potencialmente perigosa (Emerich et al., 2005).

O CP protege o cérebro contra insultos neurotóxicos nocivos, utilizando sistemas de desintoxicação: a glutatona, a cisteína e as metalotioneínas que têm a capacidade de sequestrar os agentes tóxicos que circulam no CSF; a superóxido dismutase, a glutatona-S-transferase, a glutatona peroxidase e a glutatona redutase que são enzimas de proteção contra o *stress* oxidativo dos radicais livres e os sistemas de transporte de iões orgânicos e proteínas de resistência a múltiplas drogas que retiram os compostos nocivos do CSF (Emerich et al., 2005, Mortazavi et al., 2014).

O CP tem também um papel importante na defesa contra organismos invasores pois é um mediador entre o cérebro e o sistema imunológico periférico. Isto é suportado pela presença de células linfoides, pela capacidade para induzir citocinas pró-inflamatórias, pela expressão de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade e de moléculas para a adesão leucocitária (Mortazavi et al., 2014). Estão presentes também outras células que agem como células fagocíticas, as células *Kolmer*, que expressam moléculas do complexo maior de histocompatibilidade e proliferam quando em contacto com endotoxinas (Emerich et al., 2005). Além disso, o CP tem ainda como função a absorção e remoção de produtos residuais do CSF. Em estudos experimentais, utilizando vários tipos de marcadores, verificou-se que as CPEC são capazes de absorver várias substâncias, incluindo as proteínas do CSF. Utilizam também o transporte ativo para moléculas maiores, e por pinocitose, formam vesículas em que o seu conteúdo sofre digestão intracelular, ou é libertado através da superfície basolateral das células epiteliais para o estroma dos tecidos conjuntivos e vasos sanguíneos (Mortazavi et al., 2014).

2. O Paladar

A capacidade de perceber, reconhecer e responder a estímulos é essencial para a sobrevivência dos organismos. O paladar é um dos sentidos básicos, que na cavidade oral tem duas funções principais: o reconhecimento de nutrientes essenciais e a proteção contra compostos que são tóxicos ou nocivos (Cygankiewicz et al., 2014, Roper, 2007, Sugita, 2006). O homem pode detectar e discriminar cinco estímulos diferentes: doce, amargo, *umami*, ácido e salgado (Chaudhari and Roper, 2010, Cygankiewicz et al., 2014, Niki et al., 2010).

Na cavidade oral, o passo inicial na percepção do sabor é mediado por células epiteliais especializadas, as células recetoras gustativas, que estão organizadas nas papilas gustativas. Já foram identificados recetores membranares para os cinco sabores: recetores acoplados à proteína G (GPCRs) e recetores do tipo canal (Niki et al., 2010, Roper, 2007). Os padrões de expressão destes recetores sugerem que cada sabor pode ser codificado por uma população separada de células da papila gustativa (Niki et al., 2010). Os sinais gerados são processados pelo SNC, resultando na percepção do sabor (Sugita, 2006).

2.1. A via de sinalização do paladar

2.1.1. Os estímulos Doce, Amargo e *Umami*

As sensações do sabor doce, amargo e *umami* são iniciadas pela interação da molécula em causa com GPCRs na membrana apical das células recetoras gustativas. Duas famílias de recetores gustativos de mamífero, T1Rs e T2Rs, têm sido implicadas na deteção destes sabores (Niki et al., 2010).

Os sabores doce e *umami* são reconhecidos pela família T1R (T1R1, T1R2 e T1R3) que pertence à família C dos GPCRs e é caracterizada por possuir uma extremidade N terminal extracelular extensa (Cygankiewicz et al., 2014, Roper, 2007). Os T1Rs organizam-se em complexos heterodiméricos para reconhecer o doce (T1R2-T1R3) ou o *umami* (T1R1-T1R3) (Niki et al., 2010). O heterodímero T1R2-T1R3 é ativado por uma ampla variedade de substâncias doces: açúcares naturais (sacarose, frutose, glicose, maltose); aminoácidos doces (D-triptofano, D-fenilalanine, D-serina); edulcorantes (aspartame, ciclamato, sacarina) e proteínas doces (monelina, brazzein, taumatina). O heterodímero T1R1-T1R3 responde exclusivamente ao L-glutamato e L-aspartato no homem e a todos os aminoácidos em roedores (Cygankiewicz et al., 2014, Niki et al., 2010).

As substâncias que causam o sabor amargo são reconhecidas pela família de recetores T2R, que pertence à família A de GPCRs, e possuem uma extremidade N terminal extracelular curta. No ser humano, foram identificados 25 membros desta família enquanto que em ratinhos foram identificados 34 (Roper, 2007, Sugita, 2006). Os recetores T2R são ativados por diversos compostos amargos como as amidas (denatónio) e os alcaloides (estricnina, cafeína e quinino). Contudo, alguns aminoácidos, ureia, ácidos gordos, fenóis, aminas, ésteres e sais de K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} são também responsáveis pelo sabor amargo. Acredita-se que o sabor amargo seja

importante para evitar o consumo de alimentos prejudiciais, tendo um limiar de ativação inferior ao dos outros sabores (Roper, 2007). A célula recetora gustativa pode responder a um ou mais compostos amargos mas não a todos, pois as células expressam apenas certas subclasses de T2R e não toda a família de recetores. Os genes para T2R são caracterizados pela ausência de intrões, em contraste com os genes T1R (Cygankiewicz et al., 2014).

A interação das substâncias com os recetores localizados na membrana apical das células recetoras gustativas, resulta num sinal intracelular que se manifesta pela ativação de mensageiros secundários que desencadeiam uma cascata de transmissão de sinal até à membrana basal (Cygankiewicz et al., 2014, Roper, 2007). Ambos os recetores, T1R e T2R, são co-expressos com uma molécula sinalizadora, específica do paladar, a proteína *gustducin* heterotrimérica (Cygankiewicz et al., 2014, Roper, 2007, Sugita, 2006). A transdução de sinal do sabor doce, amargo e *umami* ocorre através da ligação do ligando ao recetor, levando à dissociação da proteína G heterotrimérica, podendo ativar uma das duas vias de sinalização: uma que envolve o aumento do monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) e outra que envolve a estimulação do inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) (Cygankiewicz et al., 2014, Roper, 2007) (Figura 3).

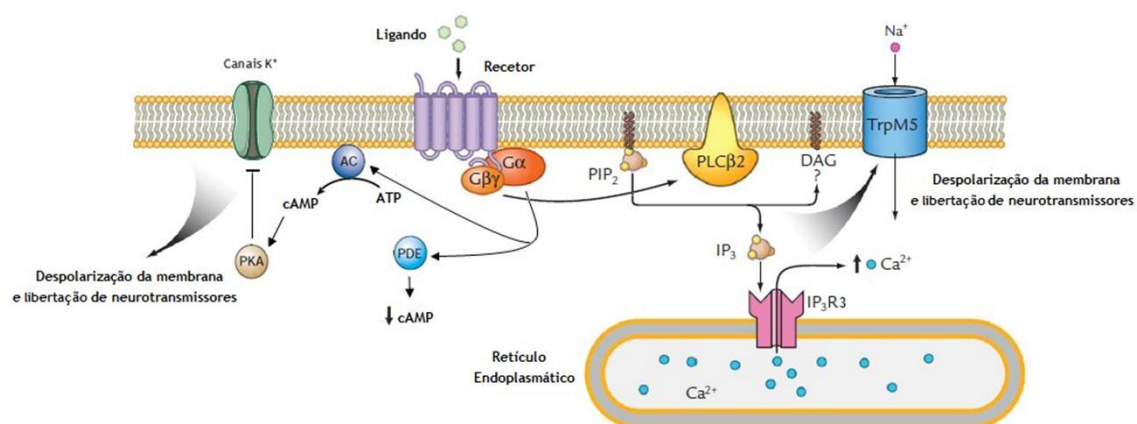


Figura 3 - Transdução de sinal dos sabores doce, amargo e *umami*. A interação dos compostos com os seus recetores resulta na ativação de mensageiros secundários que desencadeiam uma cascata de transmissão de sinal intracelular que leva à despolarização da membrana e libertação de neurotransmissores. AC - adenilato-ciclase; ATP - adenosina trifosfato; Ca²⁺ - ião cálcio; cAMP - monofosfato de adenosina cíclico; DAG - diacilglicerol; Gα - subunidade α da proteína G; Gβγ - subunidades B e γ da proteína G; IP₃ - inositol 1,4,5-trifosfato; IP₃R3 - recetor inositol-1,4,5-trifosfato tipo 3; K⁺ - ião potássio; Na⁺ - ião sódio; PDE - fosfodiesterases; PIP₂ - fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PKA - proteína cinase A; PLCβ2 - fosfolipase C β2; TrpM5 - canal iónico recetor de potencial transitório M5. Adaptado de (Mennella et al., 2013).

Na via de sinalização do cAMP, a subunidade α pode causar tanto o aumento dos níveis de cAMP, pela ativação da adenilato-ciclase (AC), como a diminuição pela ativação de fosfodiesterases (PDE). Assim, a ligação dos ligandos aos recetores através da proteína G ativa a AC que converte o ATP em cAMP, que por sua vez ativa a proteína cinase A (PKA) que fosforila os canais de K⁺ presentes na membrana basal fechando-os. Isto leva à despolarização das células recetoras gustativas resultando no influxo de iões de Ca²⁺ através de canais de Ca²⁺ dependentes da voltagem e na libertação de neurotransmissores (Cygankiewicz et al., 2014, Roper, 2007). Os

baixos níveis de cAMP são necessários para manter a sinalização adequada de Ca^{2+} , através da desinibição de canais de nucleótidos cíclicos inibidos para aumentar o Ca^{2+} intracelular (Welcome et al., 2015).

Na outra via de sinalização, as subunidades $\beta\gamma$ da proteína G ativam a fosfolipase C $\beta 2$ (PLC $\beta 2$), que hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) em diacilglicerol (DAG) e IP_3 . Subsequentemente, o IP_3 ativa o seu recetor (recetor inositol-1,4,5-trifosfato tipo 3 ($\text{IP}_3\text{R3}$)) nos reservatórios de Ca^{2+} , levando à libertação de Ca^{2+} das reservas intracelulares. Aumentos rápidos nas concentrações de Ca^{2+} intracelular estimulam o canal iónico recetor de potencial transitório M5 (TrpM5), localizado na membrana basolateral, levando ao influxo de Na^+ e à despolarização da membrana, e assim à libertação de neurotransmissores (Niki et al., 2010, Sugita, 2006).

2.1.2. Os estímulos Ácido e Salgado

A deteção de compostos ácidos e salgados é mediada por canais iónicos (Figura 4). A perceção de compostos ácidos, na boca, pode funcionar para proteger contra comida estragada, frutos imaturos ou substâncias tóxicas (Sugita, 2006). O principal estímulo do sabor ácido parece ser mediado por protões (H^+) que atravessam a membrana celular, através de canais e permutadores de iões, acidificando o citoplasma e provocando a despolarização da membrana (Roper, 2007). Alternativamente, transportadores de iões regulados pelo pH modulam a concentração intracelular de iões, tais como Na^+ , K^+ e Cl^- alterando o equilíbrio iónico e conduzindo também à despolarização da membrana. Muitos recetores têm sido implicados na deteção deste sabor, tais como: canais iónicos de deteção de ácido (ASICs), canais de Na^+ sensíveis à amilorida (ENaC), canais de K^+ operados por nucleótidos cíclicos ativados por hiperpolarização (HCNs), canais de Cl^- sensíveis ao 5-nitro-2-(3-fenilpropilamina)-ácido benzóico (NPPB) e heterodímero 1L3 e 2L1 da doença renal policística 1 (PKD1L3-PKD2L1) (Niki et al., 2010, Roper, 2007). Quanto ao sabor salgado, este tem um papel importante na integração do cloreto de sódio e de outros sais, e na manutenção da homeostasia iónica e da água. O mecanismo descrito para a perceção de compostos salgados envolve uma corrente de iões Na^+ , que flui para dentro das células gustativas, através de canais catiónicos, ENaC, presentes na membrana apical. Os iões Na^+ também podem atravessar o epitélio através das junções apertadas e entrar nas células recetoras gustativas através dos canais, insensíveis à amilorida, localizados basolateralmente. O influxo de Na^+ provoca diretamente a despolarização da membrana (Sugita, 2006).

A despolarização da membrana, comum à transdução de sinal dos ácido e salgado, leva à geração de potenciais de ação que envolvem a ativação de canais Na^+ e Ca^{2+} dependentes da voltagem provocando a entrada destes, e a saída de K^+ através da ativação de canais K^+ dependentes da voltagem. Os iões Na^+ transportados para as células gustativas são extrudidos por ATPases Na^+/K^+ localizadas basolateralmente. Esta despolarização, provocada pelo movimento de iões, leva ao aumento das concentrações de Ca^{2+} intracelulares e à libertação de neurotransmissores que vão estimular as fibras nervosas aferentes (Sugita, 2006).

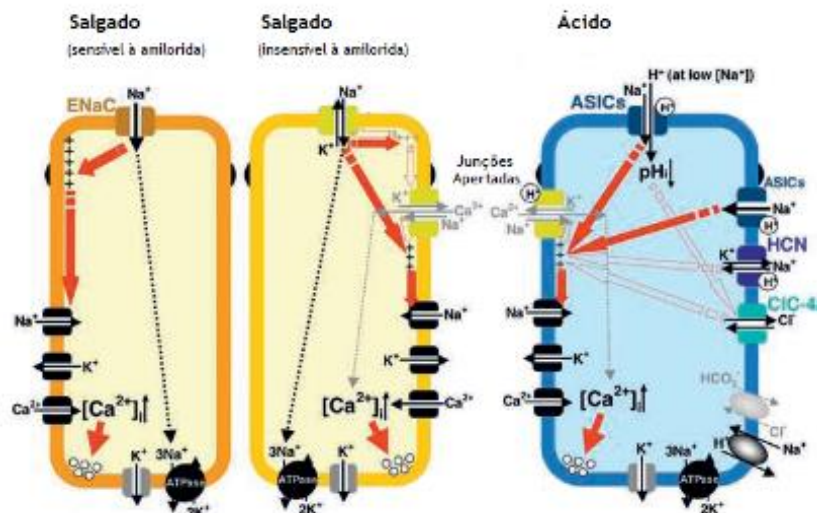


Figura 4 - Transdução de sinal dos sabores salgado e ácido. Canais iônicos medeiam a detecção de compostos ácidos e salgados. O influxo de cátions através dos canais induz a despolarização da membrana levando à produção de potenciais de ação, o que resulta na libertação de neurotransmissores nas fibras nervosas aferentes. ASICs - canais iônicos de detecção de ácido; ATPases - proteínas integrais da membrana; Ca^{2+} - íon cálcio; $[Ca^{2+}]_i$ - concentração de cálcio intracelular; CIC-4a - canal de Cl^- ; Cl^- - íon cloro; ENaC - canais de Na^+ sensíveis à amilorida; H^+ - próton; HCN - canal de K^+ operado por nucleótidos cíclicos ativados por hiperpolarização; HCO_3^- - bicarbonato; K^+ - íon potássio; Na^+ - íon sódio; pH - potencial de hidrogénio. Adaptado de (Sugita, 2006).

2.2. A via de sinalização do paladar noutros tecidos

A expressão dos recetores gustativos e das moléculas da via de transdução do paladar foi originalmente descoberta na cavidade oral, mas tem sido demonstrada em outros órgãos tais como, o trato gastrointestinal, os testículos, os espermatozoides, os pulmões, o pâncreas, o coração, os rins, a tiroide, a pele, o cérebro e o CP (Clark et al., 2015, Laffitte et al., 2014, Li, 2013, Liman et al., 2014, Quintela et al., 2013, Wolfle et al., 2015, Yamamoto and Ishimaru, 2013).

A expressão de recetores T2R bem como de subunidades α de proteínas G implicadas na transdução de sinal do paladar (*gustducin* e *transducin*) foi demonstrada, por reação em cadeia de polimerase da transcrição reversa (RT-PCR), na mucosa gastrointestinal de rato e ratinho e por RT-PCR, imunohistoquímica e *western blotting* na linha celular STC-1 (linha celular enteroendócrina). A estimulação das células STC-1 com compostos amargos, promoveu o aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} (Wu et al., 2002). Jang e os seus colaboradores demonstraram, por RT-PCR e imunofluorescência que os recetores T1R2 e T1R3, a proteína *α-gustducin* e outros elementos da via de transdução do paladar, como a PLCB2 e o TrpM5, são expressos nas células L duodenais humanas e na linha celular L humana NCI-H716, e que a *α-gustducin* também se encontra expressa nas células L intestinais de ratinho. A ingestão de glucose por ratinhos deficientes em *α-gustducin* mostrou diminuição na secreção do péptido tipo glucagon 1 (GLP-1) e na regulação de insulina e glucose no plasma. A secreção de GLP-1 a partir das células NCI-H716 foi promovida por estímulos doces e bloqueada pela *lactisole*, um antagonista do recetor, ou pela diminuição da expressão da *α-gustducin* por silenciamento com ácido ribonucleico (RNA) de interferência (siRNA). Assim, estes dados indicam que as células L

do intestino funcionam como um sensor de glucose através de uma via de sinalização semelhante à utilizada pelas células gustativas na língua (Jang et al., 2007). Outro estudo, através de RT-PCR, hibridação *in situ* e imunohistoquímica, também demonstrou que o recetor T1R3 está expresso no duodeno e nas células da mucosa gástrica, tendo um papel importante na deteção de compostos no lúmen e na secreção de grelina (Hass et al., 2010).

Foi criado um ratinho transgénico para investigar a distribuição do recetor T2R5 em secções de testículos, tendo sido observada a sua expressão através de imunohistoquímica e coloração com X-gal. A expressão do recetor T1R3 e de outros componentes da via do paladar (*a-gustducin*, Ggamma13, PLCB2) foi demonstrada na espermatogénese, sendo que o canal TrpM5 apenas foi observado na fase de espermatídios mais tardia (Li and Zhou, 2012). A expressão de recetores do sabor amargo (T2Rs) foi identificada em testículos de ratinhos por transcriptase reversa e PCR em tempo real do produto da transcrição reversa (RT-qPCR) e dois recetores (T2R105 e T2R108) foram localizados em células pós-meióticas, por hibridação *in situ*. Análises funcionais mostraram que os espermatídios e espermatozoides de ratinhos responderam a componentes amargos aumentando as concentrações intracelulares de Ca²⁺ livre. Estas respostas foram suprimidas por um bloqueador específico do estímulo amargo ou pelo *knockout* do gene para a proteína G *a-gustducin*. Estes dados sugerem que as células germinativas masculinas utilizam os recetores T2R para detetar produtos químicos no ambiente que podem afetar o comportamento do esperma e a fertilização (Xu et al., 2013). Outros estudos mostraram que a *a-gustducin* em espermatozoides de mamífero pode desempenhar um papel funcional quer na transdução de sinal de controlo da quimiotaxia do esperma quer no processo de motilidade do esperma (Fehr et al., 2007). Estudos posteriores mostraram também que os recetores Tas1R1 e Tas1R3 são expressos em espermatozoides humanos e de ratinho, sendo que a sua localização é restrita a segmentos distintos do flagelo e do acrossoma do espermatozoide, e ratinhos *knockout* para o recetor Tas1R1 revelaram anomalias na espermatogénese (Meyer et al., 2012). A expressão de recetores do amargo (T2Rs) e da *a-gustducin*, da PLCB2 e do TrpM5 foi detetada no epitélio ciliado das vias respiratórias. Um estímulo amargo, neste tecido, mostrou um aumento na concentração intracelular de Ca²⁺ e um aumento da frequência do batimento ciliar. Assim, os cílios do epitélio das vias respiratórias parecem detetar substâncias nocivas e iniciar um mecanismo de defesa para eliminar os compostos prejudiciais inalados (Shah et al., 2009). Outros estudos relataram que as células do músculo liso das vias respiratórias humanas expressam recetores Tas2Rs e, ao aplicar agonistas dos recetores, verificaram um relaxamento das células por um mecanismo que envolve o aumento da concentração de Ca²⁺ intracelular e a hiperpolarização da membrana (Deshpande et al., 2010). Um outro estudo em roedores, revelou que os elementos da cascata de transdução do paladar, incluindo os recetores Tas1R e Tas2R, a *a-gustducin*, a PLCB2 e o TrpM5, são expressos pelas células quimiosensoriais solitárias distribuídas ao longo das vias respiratórias, consideradas como células quimiorrecetoras que atuam contra agentes irritantes e patogénicos inalados (Tizzano et al., 2011).

A expressão e função dos recetores do doce (Tas1R2-Tas1R3) foram também analisadas em ilhotas pancreáticas de ratinho e na linha celular β pancreática MIN6 demonstrando-se

expressão nas células β pancreáticas e secreção de insulina através de mecanismos dependentes de Ca^{2+} e cAMP após ativação (Nakagawa et al., 2009). Num outro estudo, mostrou-se que os recetores do *umami* (Tas1R1-Tas1R3) e a *a-gustducin* são expressos na linha celular β pancreática de ratinho MIN6, com localização na membrana plasmática. A administração de aminoácidos causou o aumento das concentrações intracelulares livres de IP_3 e Ca^{2+} , e um aumento significativo da libertação de insulina, sendo que estes aumentos diminuíram com a aplicação de um antagonista do recetor Tas1R3, demonstrando-se que o heterodímero Tas1R1-Tas1R3 regula a secreção de insulina (Oya et al., 2011).

A expressão dos recetores Tas2R, Tas1R1 e Tas1R3 foi ainda demonstrada no tecido cardíaco de roedores e humanos, em cardiomiócitos e fibroblastos, e em células cardíacas isoladas, podendo funcionar como sensores de nutrientes no coração (Foster et al., 2013). Num estudo com ratinhos transgênicos, foi demonstrada a expressão dos recetores do sabor amargo Tas2R105 e Tas2R106 e da *a-gustducin* no tecido renal e a sua importância na manutenção da estrutura dos glomérulos e dos túbulos renais (Liu et al., 2015). A expressão de recetores Tas2Rs e da *a-gustducin* foi ainda mostrada em células foliculares da tiroide (tireocitos) humanas e de ratinho e na linha de tireocitos humana Nthy Ori 3-1, com relevância para a função tiroideia (Clark et al., 2015). Recentemente, a expressão dos recetores Tas2R1 e Tas2R38 foi mostrada na pele humana, com co-localização com a proteína *a-gustducin* nas células HaCaT e nos queratinócitos primários, e demonstrando a sua funcionalidade nos queratinócitos (Wolfle et al., 2015).

A expressão dos genes recetores do paladar *Tas1R1*, *Tas1R2* e *Tas1R3* e dos seus genes associados à proteína G (*Gnat3*, *Gnb3* e *Gng13*) foi descrita no cérebro de mamíferos, particularmente no hipotálamo, hipocampo e córtex, através de hibridação *in situ* (Ren et al., 2009). Mostrou-se também que os recetores T2Rs (T2R4, T2R107 e T2R38) são expressos em várias regiões do cérebro de rato, tais como no tronco cerebral, cerebelo, córtex e núcleo *accumbens*, e estudos funcionais para o recetor T2R4 mostraram um aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} após estímulo com compostos amargos, sugerindo que este recetor é funcional (Singh et al., 2011). Por hibridação *in situ* a expressão dos recetores do paladar Tas1R2 e Tas1R3 foi identificada nas CPEC (Ren et al., 2009). Um estudo de *microarrays*, realizado previamente pelo nosso grupo de investigação, para analisar o efeito das hormonas sexuais no transcrito do CP de rato, mostrou a existência de várias vias de sinalização reguladas pelas hormonas, entre as quais a via de sinalização do paladar. Estes resultados mostraram um facto até aí desconhecido, a via de transdução de sinal do paladar está presente no CP (Quintela et al., 2013). Mais recentemente, mostrámos a expressão dos recetores Tas1R1, Tas1R3, Tas1R2, Tas2R40 e Tas2R109 e das moléculas PLCB2, Itpr3, TrpM5, AC4, Scnn1g, Gnb3 e Gnat3 envolvidas na via do paladar quer ao nível de RNA como de proteína, no CP. Por ensaios de imunofluorescência, em explantes de CP, mostrámos também a co-expressão dos recetores do sabor doce (Tas1R2 e Tas1R3) e do sabor *umami* (Tas1R1 e Tas1R3) e das moléculas da via de sinalização do paladar com um marcador da membrana plasmática. A ativação da via do amargo em culturas primárias de CPEC resultou no aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+}

mostrando que a via de transdução de sinal do amargo está funcional (Gonçalves I, comunicação pessoal).

3. Hormonas Esteroides

As hormonas esteroides regulam uma grande variedade de processos fisiológicos, como a promoção do desenvolvimento e a regulação do metabolismo (Miller and Auchus, 2011, Tsai and Beavo, 2011). Vários órgãos, incluindo a glândula adrenal, os testículos, os ovários e a placenta, sintetizam estas hormonas esteroides, sendo denominados por órgãos esteroidogénicos (Sanderson, 2006). Baulieu e os seus colaboradores, na década de 80, observaram que os esteroides, tais como a pregnenolona e a desidroepiandrosterona (DHEA) estavam presentes em concentrações mais elevadas no sistema nervoso do que no plasma, surgindo assim a primeira evidência de que o cérebro é um órgão esteroidogénico (Baulieu, 1998, Mellon and Griffin, 2002). Interferências na biossíntese destas hormonas esteroides podem resultar em alterações na diferenciação, crescimento e desenvolvimento sexual, na reprodução e no desenvolvimento de diversos cancros (Sanderson, 2006).

3.1. Síntese de estrogénios

A biossíntese de hormonas esteroides é designada por esteroidogénese e envolve uma série de reacções enzimáticas, através das quais o colesterol é convertido biologicamente em hormonas esteroides ativas, tais como os glucocorticoides, os mineralocorticoides, os androgénios, os estrogénios e a progesterona (Ghayee and Auchus, 2007, Miller and Auchus, 2011, Sanderson, 2006). A síntese das hormonas esteroides é mediada por enzimas do citocromo P450 (CYPs) e das hidroxisteroides desidrogenases (HSDs) (Tsai and Beavo, 2011). Os estrogénios são um grupo de hormonas esteroides com muitas funções fisiológicas, que regulam o crescimento, diferenciação e funções de diversos tecidos no corpo humano (Bjornstrom and Sjoberg, 2005), e podem existir no organismo sob a forma de estrona (E1), 17- β -estradiol (E2) e estriol (E3), sendo o E2 a forma fisiologicamente ativa do estrogénio (Kumar et al., 2010). As hormonas esteroides que têm como local de síntese o sistema nervoso são designadas neuroesteroides, sendo este processo denominado neuroesteroidogénese (Baulieu et al., 2001). Estes esteroides têm uma grande variedade de funções biológicas, tais como a regulação da mielinização, do crescimento de neurónios e da sinaptogénese no SNC, bem como a neuroprotecção (Wojtal et al., 2006). A síntese destas hormonas esteroides no cérebro tem como precursor inicial o colesterol, sendo também necessário a presença de enzimas esteroidogénicas (Mellon et al., 2001).

3.2. Mecanismo de ação dos estrogénios

Foram identificados três tipos de recetores de estrogénio, a partir dos quais os estrogénios podem mediar os seus efeitos fisiológicos: duas isoformas de recetores de estrogénios (ERs), a alfa (ER α) e a beta (ER β), e o recetor de estrogénio acoplado à proteína G (GPER), especificamente, o recetor de estrogénio 30 acoplado à proteína G (GPR30) (Prossnitz et al., 2008).

Os ERs pertencem à superfamília de recetores nucleares que funcionam como fatores de transcrição quando estão ligados aos seus ligandos (Osborne and Schiff, 2005). No que diz respeito à sua expressão nos diferentes tecidos humanos, cada um dos subtipos de ERs, encontra-se diferencialmente expresso pelo organismo. O ER α encontra-se principalmente nos tecidos associados à reprodução (útero, mamas, vagina), enquanto que o ER β se encontra principalmente em tecidos não envolvidos na reprodução como os rins, sistema cardiovascular, sistema imunológico, SNC, trato urogenital, trato gastrointestinal e pulmões (Millas and Liquidato, 2009). Estes recetores são também expressos no cérebro, sendo que os ER α estão presentes em maior concentração no hipotálamo e os ER β no córtex cerebral (Janicki and Schupf, 2010). O GPR30 é uma proteína integral de membrana com domínios transmembranares, em que a sua expressão tem sido detetada em tecidos humanos tais como o coração, fígado, intestino, próstata, ovários, rins, cérebro e pulmões (Micevych and Dominguez, 2009, Olde and Leeb-Lundberg, 2009).

Os estrogénios podem ligar-se aos ERs para modificar a atividade transcricional, produzindo mecanismos de ação genómica, e podem levar a uma ativação rápida de cascatas de sinalização, produzindo assim mecanismos de ação não genómica (Shanle and Xu, 2011).

Mecanismos de ação genómica

Os mecanismos de ação genómica são normalmente lentos, levando horas até que as ações biológicas se manifestem (Silva et al., 2010). Os ERs quando estão no seu estado inativo, localizados nuclearmente ou citoplasmaticamente, apresentam-se ligados a proteínas *chaperones* que estabilizam os recetores. Quando o estrogénio se liga ao domínio de ligação do recetor, o ER torna-se ativo devido a mudanças conformacionais que permitem a sua dissociação das proteínas *chaperones*, havendo assim a difusão do complexo hormona-recetor para o núcleo da célula. De seguida, ocorre a dimerização deste complexo e a ligação do dímero aos elementos responsivos ao estrogénio (ERE). Após a ligação aos ERE, inicia-se a transcrição génica, que é regulada por co-fatores proteicos (co-ativadores ou co-repressores) que podem influenciar a ação transcricional do recetor (Gruber et al., 2002, Millas and Liquidato, 2009).

Os ERs, para além da interação direta com os ERE, também podem regular a transcrição de genes alvo sem se ligarem diretamente ao ácido desoxirribonucleico (DNA), modulando a atividade de outros fatores de transcrição (Gruber et al., 2002). Neste caso o complexo hormona-recetor interage com fatores de transcrição ligados ao DNA (interação proteína-

proteína), tais como a proteína de especificidade 1 (Sp1) e a proteína ativadora 1 (AP-1), que ativam a transcrição genética (Figura 5) (Osborne and Schiff, 2005).

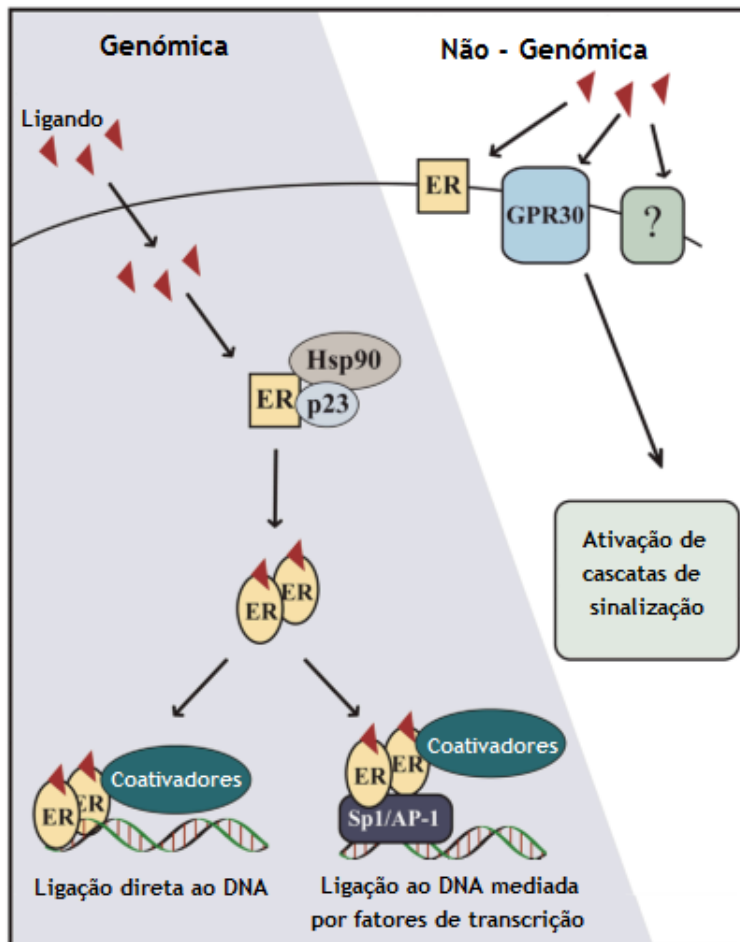


Figura 5 - Mecanismos de ação dos estrogénios. Os estrogénios podem desencadear dois tipos distintos de mecanismos de ação: mecanismos de ação genómica e mecanismos de ação não genómica. A sinalização genómica ocorre quando os ligandos entram na célula e se ligam ao ER tornando-o ativo, o que permite a sua dissociação das proteínas *chaperones* estabilizadoras (Hsp90 e p23) e consequentemente a sua dimerização. Os dímeros podem ligar-se diretamente ao DNA em ERE ou indiretamente através de outros fatores de transcrição, como Sp1 ou AP-1. A sinalização não genómica ocorre quando os ligandos se ligam a recetores membranares, levando à ativação de cascatas de sinalização. AP-1 - proteína ativadora 1; ER - recetor de estrogénio; GPR30 - recetor de estrogénio 30 acoplado à proteína G; Hsp90 - *heat shock protein* 90; p23 - proteína *cochaperone* para a Hsp90; Sp1 - proteína de especificidade 1. Adaptado de (Shanle and Xu, 2011).

Mecanismos de ação não genómica

Os mecanismos de ação não genómica envolvem uma sinalização celular rápida (Prossnitz and Barton, 2011). Esta sinalização estrogénica pode ser mediada pela interação dos ligandos com recetores associados à membrana plasmática, ERs ou GPR30 independentes dos ERs, levando assim à ativação de cascatas de sinalização do fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) e da proteína cinase ativada por mitogénio (MAPK), a variações no cálcio intracelular ou à estimulação da produção de cAMP (Shanle and Xu, 2011) (Figura 5).

Os neuroesteroides atuam no sistema nervoso por mecanismos autócrinos ou parácrinos, podendo regular a expressão génica através da ligação a recetores nucleares ou afetando a neurotransmissão (Wojtal et al., 2006).

3.3. As hormonas esteroides e o plexo coroide

As hormonas sexuais têm propriedades neuroprotetoras em doenças neurodegenerativas, que são frequentemente relacionadas com a redução dos níveis destas hormonas (Bourque et al., 2009, Carroll and Rosario, 2012, Charalampopoulos et al., 2008). Tem sido demonstrado que o CP expressa uma grande variedade de recetores, incluindo os recetores das hormonas sexuais, como os ERs, sugerindo que é um tecido alvo para estas hormonas, e sintetiza alguns péptidos implicados na neuroprotecção e neurodegeneração que são responsivos às hormonas (Hong-Goka and Chang, 2004, Quintela et al., 2009, Quintela et al., 2011).

O estudo de *microarrays* realizado pelo nosso grupo de investigação, para além de mostrar que a via de transdução do paladar se encontra expressa no CP de rato, mostrou também que o declínio dos níveis hormonais induz um aumento na expressão dos genes associados à via de transdução do paladar, evidenciando a sua regulação pelas hormonas esteroides sexuais. Estes resultados salientaram a importância do CP como um tecido sensorial no cérebro, fazendo a vigilância da composição química do CSF (Quintela et al., 2013). Assim, é provável que as hormonas sexuais afetem a deteção do sabor não apenas ao nível das papilas gustativas (Faas et al., 2010), mas também no SNC, podendo estes genes serem relevantes como novos potenciais alvos terapêuticos em desordens neurológicas.

4. Desreguladores Endócrinos

Os desreguladores endócrinos (DE) são compostos exógenos que se encontram dispersos no meio ambiente e que influenciam a homeostasia, desenvolvimento e proliferação celular, mimetizando ou inibindo a ação de hormonas endógenas ou alterando a regulação hormonal do sistema endócrino, provocando efeitos adversos na saúde, como anomalias reprodutivas e alteração no desenvolvimento. Podem interferir com a síntese, armazenamento, metabolismo, transporte, libertação e ligação ao recetor de hormonas endógenas (Casals-Casas and Desvergne, 2011, Flint et al., 2012, Yoon et al., 2014).

O grupo de moléculas identificadas como DE é altamente heterogéneo e inclui compostos químicos industriais, compostos utilizados na indústria do plástico e em produtos de consumo, pesticidas, agentes farmacêuticos e metais pesados (Casals-Casas and Desvergne, 2011, De Coster and van Larebeke, 2012, Yoon et al., 2014). A maior parte dos DE são produtos químicos sintéticos e, destes, o bisfenol A (BPA) é um dos mais utilizados e mais estudado (Bhandari et al., 2015, Rogers et al., 2013).

4.1. Bisfenol A

O BPA é um monómero utilizado no fabrico de plásticos de policarbonato e de resinas epóxi. Estes são usados em numerosos produtos e aplicações, tais como: revestimento de enlatados, recipientes de armazenamento de alimentos e bebidas, papel térmico, selantes dentários, equipamentos médicos e eletrónicos e materiais de construção. O BPA também é usado como aditivo em outros tipos de plásticos, como o cloreto de polivinilo (PVC) (Bhandari et al., 2015, Casals-Casas and Desvergne, 2011, Geens et al., 2011, Meeker, 2012, Resnik and Elliott, 2015, Rezg et al., 2014). As moléculas do BPA, polimerizadas, estão ligadas por ligações éster e com a hidrólise dos polímeros, por exposição a temperaturas elevadas ou a substâncias básicas ou ácidas, as moléculas podem libertar-se a partir dos recipientes em contacto com as bebidas e alimentos tornando assim possível a ingestão de BPA (Alonso-Magdalena et al., 2012, Fenichel et al., 2013, Geens et al., 2011, Rubin, 2011). A sua libertação também pode ocorrer através dos monómeros não ligados que permanecem depois da polimerização do BPA (Casals-Casas and Desvergne, 2011). A libertação direta do BPA no ambiente para a atmosfera, água e solo ocorre durante as atividades de fabrico e processamento (Mileva et al., 2014).

Devido à sua resistência ao calor e elasticidade, o uso de BPA tem aumentado progressivamente em todo o mundo, com uma produção anual superior a 10 milhões de toneladas (Fenichel et al., 2013). Apesar da meia-vida curta, é ubíquo no ambiente e no contacto com o homem devido à sua libertação contínua e à sua ampla utilização em bens de consumo (Flint et al., 2012, Geens et al., 2011).

4.1.1. Mecanismo Molecular de Ação do BPA

O BPA é considerado um xenoestrogénio, sendo que interfere com a atividade dos estrogénios endógenos, como o E2, ligando-se aos ERs. Os ERs desencadeiam respostas celulares através da transdução de sinal tanto genómica como não-genómica (Mileva et al., 2014, Wetherill et al., 2007). A transdução de sinal genómica é um processo lento através do qual os ERs regulam a transcrição e por sua vez a expressão génica (Mileva et al., 2014). Assim, o BPA exerce efeitos estrogénicos através dos ERs, perturbando principalmente a atividade dos recetores nucleares (Mileva et al., 2014, Wetherill et al., 2007). Liga-se a ambos os ERs nucleares, ER α e ER β , com uma afinidade 10 vezes maior para este último, induzindo sinais estrogénicos que modificam a expressão dos genes responsivos ao estrogénio (Vandenberg et al., 2013). Apesar de, inicialmente, a desregulação endócrina causada pelo BPA ter sido considerada fraca em comparação com o E2, estudos mais recentes demonstraram que o BPA pode estimular algumas respostas celulares em concentrações muito baixas, abaixo dos níveis esperados para a ligação do BPA aos ERs nucleares (Mileva et al., 2014, Vandenberg et al., 2010).

Alguns dos efeitos do BPA podem ocorrer através da ativação de sistemas de sinalização celular associados a recetores que estão localizados na membrana celular e não no núcleo da célula. Estas ações não-genómicas são rápidas e envolvem a modificação de proteínas reguladoras

(Mileva et al., 2014, Welshons et al., 2006). Neste caso a ação do BPA tem a mesma eficácia e potencial que o E2 (Rochester, 2013).

O BPA é geralmente considerado um agonista dos ERs, mas também pode antagonizar as ações dos estrogénios em certos tecidos, incluindo o cérebro e o útero (Bhandari et al., 2015). Para além disto, o BPA exerce outras atividades de desregulador endócrino: efeitos sobre os sistemas de androgénio, perturbação na função hormonal da tiroide, diversos efeitos no desenvolvimento, diferenciação e função do SNC bem como do sistema imunitário (Wetherill et al., 2007).

4.1.2. Exposição ao BPA

A ingestão oral é considerada a principal fonte de exposição do homem ao BPA; no entanto, a absorção dérmica e a inalação de poeiras no ar contaminado são outras vias prováveis (Fenichel et al., 2013, Mileva et al., 2014, Rubin, 2011). Acredita-se assim que os alimentos, em particular a comida enlatada, são a maior fonte de exposição dos humanos ao BPA (Geens et al., 2011, Resnik and Elliott, 2015, Rezg et al., 2014). Num estudo recente no Texas, mediu-se a concentração de BPA em 204 amostras de alimentos frescos, congelados e enlatados. O BPA foi detetado em 73% das amostras de alimentos enlatados, enquanto que nos alimentos não-enlatados foi detetado em apenas 7% e em baixas concentrações. A ingestão diária foi calculada como 12.6 ng/kg-dia, dos quais 12.4 ng/kg-dia foram de alimentos enlatados. Isto ressalta a importância dos alimentos enlatados na exposição global dos adultos ao BPA (Lorber et al., 2015). Depois de ser ingerido, o BPA é rapidamente metabolizado no fígado para formar dois metabolitos principais, BPA glucuronido e BPA sulfato, que são mais solúveis do que o BPA não conjugado, sendo excretados através da urina. Assim, este processo reduz significativamente a concentração de BPA não conjugado circulante no sangue. No entanto, o metabolismo não é completo e algum BPA não conjugado permanece na circulação (Mileva et al., 2014, Vandenberg et al., 2013). Contudo, estudos realizados em amostras de sangue revelaram a presença de metabolitos do BPA (BPA glucuronido), que não são removidos da circulação tão eficientemente (Vandenberg et al., 2013). Em 2006, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) definiu a ingestão diária tolerável de BPA em 0.05 mg/kg de peso corporal/dia (EFSA, 2006, Mileva et al., 2014). Em janeiro de 2015, a EFSA publicou a opinião de um especialista definindo uma quantidade de ingestão diária tolerável temporária de 4 µg/kg de peso corporal/dia. Esta quantidade é 12.5 vezes menor do que a definida em 2006, de 50 µg/kg de peso corporal/dia, aguardando-se o resultado de um estudo, em curso, a longo prazo (EFSA, 2015).

A exposição dérmica foi sugerida através do contacto com papel térmico que é normalmente usado em recibos (Biedermann et al., 2010, Rezg et al., 2014). O BPA existe no papel térmico como um monómero sem ligações químicas, o que facilita a absorção dérmica (Lu et al., 2013). Num estudo realizado na Suíça, analisaram-se 13 amostras de papel de impressão térmico. 11 continham uma concentração média de BPA de 13.3 g/kg de BPA e 2 não continham BPA. Verificou-se também que no contacto com um recibo de papel de impressão térmico durante 5

segundos, cerca de 1 µg de BPA é transferida para a pele, se esta estiver bastante seca, sendo transferido cerca de dez vezes mais se a pele estiver molhada ou gordurosa (Biedermann et al., 2010). Num outro estudo realizado na Bélgica, o BPA foi detetado num total de 44 amostras de papel térmico sendo que, 73% das amostras tinham concentrações entre 9-21 mg de BPA/g de papel enquanto que as restantes amostras tinham concentrações abaixo de 0.1 mg de BPA/g de papel (Geens et al., 2012). Lu e os seus colaboradores, verificaram também a presença de BPA num total de 42 recibos de supermercado, na China. O BPA foi detetado em todas as amostras com concentrações entre 2.58-14.7 mg g⁻¹ e a ingestão diária estimada por manipulação dos recibos de supermercado foi em média 40.4 µg dia⁻¹ para um operador de caixa e 0.69 µg dia⁻¹ para a população em geral (Lu et al., 2013). Como as pessoas colocam os recibos que contêm elevadas concentrações de BPA junto do dinheiro, o BPA pode ser transferido para este e mais amplamente difundido durante o uso do dinheiro contaminado com BPA (Fan et al., 2015). Para além disso, no processo de reciclagem do papel térmico pode ocorrer a contaminação de outros papéis que anteriormente não estavam contaminados (Geens et al., 2012). Os filtros de cigarros também contêm níveis relativamente elevados de BPA, sendo para além das poeiras uma fonte de exposição através da inalação (Vandenberg et al., 2013).

Estudos no homem, têm demonstrado concentrações elevadas de BPA na urina e em outras matrizes biológicas como o soro e plasma (Fan et al., 2015, Mileva et al., 2014). Ensaio de biomonitorização descobriram que 92.6% da população dos EUA tem níveis detetáveis de BPA na urina (Calafat et al., 2008). Zhang e os seus colaboradores, determinaram a concentração de BPA total na urina (livre e conjugado) em 296 amostras de urina recolhidas na população em geral em sete países da Ásia (China, Índia, Japão, Coreia, Kuwait, Malásia e Vietname). O BPA foi detetado em 94.3% das amostras analisadas, em concentrações que variam entre <0.1-30.1 ng/mL (Zhang et al., 2011). Uma revisão de dados publicados, de mais de 80 estudos, sobre a exposição humana ao BPA indicou que a concentração de BPA no sangue humano (soro e plasma) estava entre 0.3-4.4 ng/mL (Vandenberg et al., 2007). Também é encontrado no plasma fetal, placenta e leite materno (Bhandari et al., 2015, Vandenberg et al., 2007). As medições de BPA no soro materno, soro fetal, sangue do cordão umbilical, líquido amniótico e placenta indicam que o feto em desenvolvimento pode estar exposto ao BPA numa gama entre 1-3 ng/mL (Vandenberg et al., 2007). O BPA tem sido detetado também em compartimentos ambientais, como por exemplo, na água, em águas residuais, sedimentos e biota (Geens et al., 2011).

Os DE apresentam curvas de dose-resposta não monotónicas (Mileva et al., 2014). No caso do BPA a curva dose-resposta apresenta-se em forma de U ou em forma de U invertido. Nesta curva, são observados efeitos em doses muito baixas e em doses elevadas, mas em doses intermédias não existem efeitos observáveis (Casals-Casas and Desvergne, 2011).

II. Objetivo

Efeito do Estradiol e do Desregulador Endócrino Bisfenol-A na Via do Paladar do Plexo Coroide

Um estudo prévio de *microarrays* transcritômicos realizado para avaliar o efeito das hormonas sexuais no transcrito do CP de rato, demonstrou que os genes da via de sinalização do paladar são expressos nesta estrutura cerebral, e que são regulados por estas hormonas esteroides. Considerando ainda que o BPA é um desregulador endócrino que mimetiza o efeito das hormonas esteroides, conhecido pela sua exposição contínua ao ser humano, surgiram os objetivos deste trabalho:

- A) Validar os resultados obtidos no estudo de *microarrays*, no que diz respeito à regulação estrogénica dos genes relacionados com a via de transdução do paladar, tendo como objetivos específicos:
 - A.1) Analisar o efeito do E2 na expressão dos genes da via de sinalização do paladar e esclarecer o seu mecanismo de atuação. Para isso, pretende-se realizar ensaios com CPs de ratos *Wistar Han* recém-nascidos, e aplicar estímulos de E2 a diferentes concentrações com e sem pré-tratamento com ICI;
 - A.2) Alargar o estudo da regulação da via de transdução do paladar pelos estrogénios, realizando experiências *in vivo*, com ratos *Wistar Han* fêmeas OVX e *Sham* com dois meses de idade.
- B) Estudar o efeito do BPA na expressão génica da via de transdução do paladar, realizando uma experiência *ex vivo*, em CPs de ratos *Wistar Han* recém-nascidos, com aplicação de estímulos de BPA a diferentes concentrações.

III. Material e Métodos

1. Experimentação animal

1.1. Animais

A manipulação dos animais foi executada de acordo com as normas nacionais (Decreto Lei 113/2013) e as normas recomendadas pela União Europeia (Diretiva 2010/63/UE) para o cuidado e manuseio de animais de laboratório. Neste estudo, os ensaios experimentais foram realizados *ex vivo*, em explantes de CP de ratos *Wistar Han* recém-nascidos (6 a 7 dias de idade), e *in vivo*, em ratos fêmeas *Wistar Han* (2 meses de idade).

1.1.1. Estudos *ex vivo*

Nos estudos *ex-vivo*, os ratos recém-nascidos foram anestesiados em gelo, sacrificados e os CPs dos ventrículos laterais foram recolhidos para placas de 48 poços com 250 µL de meio de cultura [Dulbecco's Modified Eagle Medium - high glucose (DMEM, Sigma-Aldrich) suplementado com 10% soro fetal bovino (FBS, Biochrom AG) e 100 unidades/mL de penicilina/streptomycina (Sigma)] com e sem estímulo, e incubados durante 6 horas a 37°C [AutoFlow DHD CO₂ Air - Jacketed Incubator (NuAire)] com uma atmosfera de 5% de CO₂. Passadas as 6 horas, os CPs foram recolhidos diretamente para o reagente TRizol (TripleXtractor; Grisp) e dissociados mecanicamente com o auxílio de um pilão, sendo depois armazenados a -80°C para a extração de RNA total.

1.1.1.1. Estímulos

Para analisar o efeito do E2 na expressão dos genes da via de transdução do paladar, os CPs recolhidos a partir de ratos *Wistar Han* recém-nascidos foram colocados numa microplaca (um par de CPs por poço) e incubados com E2 (Sigma Aldrich; 0.1, 1, 10 e 100 nM) com e sem um pré-tratamento de 90 minutos com fulvestrant (ICI, Sigma Aldrich; 100 nM), um antagonista dos ERs. O E2 e o ICI foram dissolvidos em etanol (EtOH) ou dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma Aldrich) e diluídos em meio de cultura (DMEM). A concentração final de EtOH e DMSO em cada poço foi de 0.002% (Figura 6A).

Para analisar o efeito do BPA, os CPs foram incubados com BPA (Sigma Aldrich; 10, 25, 50, 75 e 100 nM), previamente dissolvido em DMSO e diluído em meio de cultura DMEM, sendo a sua concentração final em cada poço de 1% (Figura 6A).

Realizaram-se duas condições controlo: uma apenas com o veículo utilizado (controlo) e uma condição sem estímulo e sem veículo (0 nM).

1.1.2. Estudos *in vivo*

Nos estudos *in vivo*, 16 ratos com 2 meses de idade foram divididos em 2 grupos: fêmeas controle (*Sham* - cirurgicamente abertos sem remoção das gónadas) e fêmeas ovariectomizadas (OVX) e, duas semanas depois, os animais foram anestesiados com *ketamina/xylazina* e sacrificados com a guilhotina. Após o sacrificio dos animais, os hemisférios cerebrais foram separados e recolheram-se os CPs dos ventrículos laterais, congelaram-se imediatamente em azoto líquido e foram armazenados a -80°C até serem utilizados para o isolamento de RNA total (Figura 6B).

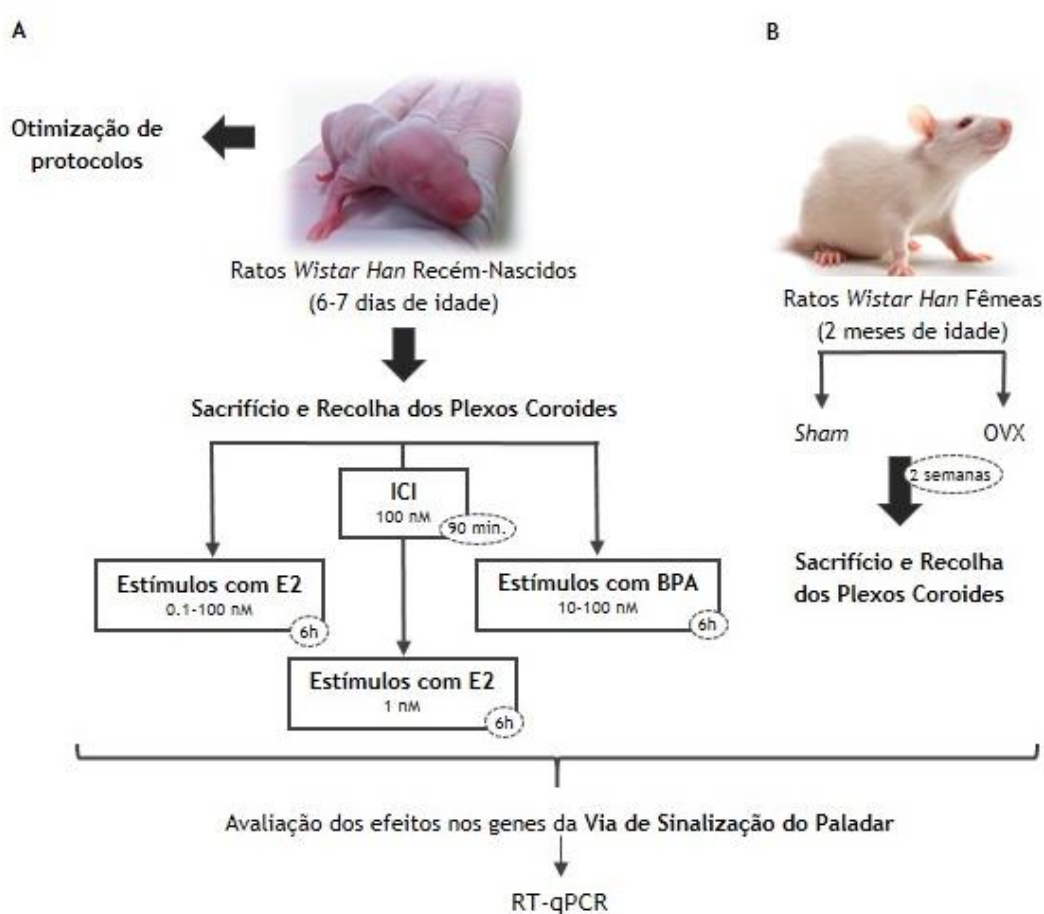


Figura 6 - Esquema dos ensaios experimentais realizados. (A) Nos estudos *ex vivo*, a avaliação dos efeitos do E2 a diferentes concentrações (0.1, 1, 10 e 100 nM) foi feita em CPs recolhidos a partir de ratos *Wistar Han* recém-nascidos durante 6 horas, com e sem um pré-tratamento de 90 minutos com ICI (100 nM) e a análise do efeito do BPA a diferentes concentrações (10, 25, 50, 75 e 100 nM) também foi feita a partir de ratos *Wistar Han* recém-nascidos durante 6 horas. (B) Nos estudos *in vivo*, foram utilizados CPs de ratos *Wistar Han* fêmeas com 2 meses de idade *Sham* e *OVX*. Durante as horas de estímulo os CPs ficaram incubados numa incubadora a 37°C com uma atmosfera de 5% de CO₂, e passadas essas horas foram sujeitos a várias técnicas, como a extração de RNA total, síntese de DNA complementar (cDNA), RT-PCR e RT-qPCR, para avaliar os efeitos nos genes da via de sinalização do paladar. BPA - bisfenol A; E2 - 17-β-estradiol; ICI - *fulvestrant*; *Sham* - controlo; *OVX* - ovariectomizadas; RT-qPCR - PCR em tempo real da transcrição reversa.

2. RNA total

Realizou-se a extração de RNA total a partir de CPs de ratos recém-nascidos *Wistar Han*, obtidos como descrito anteriormente, pela utilização do reagente *TRIzol* que permite a lise celular libertando o RNA para a solução, sem que seja comprometida a sua integridade. A obtenção de sequências de RNA puras e integras é difícil devido principalmente à sua degradação enzimática por ribonucleases (RNases) extremamente resistentes. Assim, foram utilizados agentes desnaturantes fortes que efetuam a lise celular e a inativação de RNases foi feita na água utilizada, tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). Além disso, todo o procedimento foi realizado em gelo para prevenir a atuação de RNases que possam estar presentes.

2.1. Extração de RNA total

Para a extração de RNA de CP, 500 μL de reagente *TRIzol* foram adicionados a cada microtubo de 1.5 mL, seguido de homogeneização manual com um pilão, de modo a permitir o rompimento das células e a dissolução dos componentes celulares. Após uma incubação de 5 minutos à temperatura ambiente, adicionaram-se 100 μL de clorofórmio, as amostras foram misturadas por inversão dos tubos e incubadas à temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguiu-se uma centrifugação a 4°C durante 15 minutos a 12000 g (*Mikro 200R, Hettich Zentrifugen*), onde se obteve separação em três fases distintas: a fase orgânica, cor-de-rosa, que continha as proteínas e resíduos de fenol e clorofórmio, a interfase que continha o DNA genômico e a fase aquosa, transparente, que continha o RNA total. A fase aquosa foi recuperada para um novo microtubo de 1.5 mL, onde adicionou-se 250 μL de isopropanol (-20°C) seguido de mistura por inversão, permitindo a recuperação do RNA total por precipitação. Após 10 minutos de incubação a 4°C e uma centrifugação a 4°C durante 10 minutos a 12000 g, o sobrenadante foi rejeitado e o RNA ficou precipitado em forma de *pellet* no fundo do microtubo de 1.5 mL. O *pellet* foi lavado uma vez com 500 μL de etanol a 75% em água DEPC e centrifugado a 4°C durante 5 minutos a 7500 g. O sobrenadante foi novamente rejeitado. Finalmente, o etanol excedente foi removido, tendo-se o cuidado de não secar o *pellet* completamente, e o precipitado de RNA total foi re-hidratado em 10 μL de água DEPC e armazenado a -80°C.

2.2. Determinação da integridade do RNA total

A integridade do RNA total foi analisada por eletroforese. Para tal, preparou-se um gel de agarose a 1% em Tampão TAE 1x diluído em água DEPC onde se incorporou o agente intercalante *GreenSafe (NZYTech)*, diluído 1:5 (20 μL /50 mL de gel). As amostras foram preparadas com 2 μL de amostra de RNA total, 9 μL de água estéril e 1 μL de solução de deposição 10x e depositadas no gel. Após a corrida da eletroforese a 100 V durante 30 minutos, o gel foi visualizado à luz UV num transiluminador *UVITEC (UVitec Cambridge)*. A integridade do RNA foi confirmada pela presença de duas bandas de RNA ribossômico, 18S e 28S, tendo a banda de 28S o dobro da intensidade da banda 18S.

2.3. Quantificação do RNA total

A quantificação do RNA total foi realizada usando um nanoespectrofotômetro (*NanoPhotometer™; Implen*) por medição da absorvência a 260 nm. A medição da razão $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, indicativa do grau de pureza do RNA, foi também efetuada através da leitura das absorvências a 260 e 280 nm, respectivamente os comprimentos de onda aos quais os ácidos nucleicos e as proteínas absorvem. Considera-se que o RNA está puro quando a razão entre as absorvências se encontra no intervalo entre 1.8 e 2.1, sendo que as amostras com ratio abaixo de 1.8 foram rejeitadas. Os brancos foram realizados com água DEPC com a qual se eluiu o RNA.

As amostras de RNA utilizadas neste trabalho apresentaram um grau de pureza $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ compreendido no intervalo de referência 1.8 e 2.1, sendo que as amostras que se encontravam contaminadas por DNA genómico foram tratadas com DNase I (*Sigma-Aldrich*) e as amostras degradadas excluídas.

3. Síntese de DNA complementar

A síntese de cDNA consiste numa reação enzimática que por transcrição reversa do RNA total a partir iniciadores (*primers*) permite obter uma cadeia dupla de cDNA complementar à sequência de RNA. Foi preparada uma mistura num microtubo de 1.5 mL, onde foram adicionados 2 μL de *random hexamer primers* e 1 μL de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP's, 10 mM), por reação. Em tubos de 250 μL colocou-se 1 μg de RNA total extraído de cada amostra, perfazendo-se com água estéril para um volume final de 14 μL . Em seguida, foram adicionados 3 μL da mistura previamente preparada, foram agitados suavemente e colocados no termociclador (*T100™ Thermal Cycler; Bio-Rad*) a 65°C durante 5 minutos e imediatamente transferidos para gelo. Enquanto isso, uma segunda mistura foi preparada num microtubo de 1.5 mL, onde foram adicionados 2 μL de tampão de reação 10x e 1 μL de *NZY M-MuLV Reverse Transcriptase* (200 U, *NZYTech*), por número de reações. A cada um dos tubos de 250 μL anteriores, foram adicionados 3 μL desta mistura e depois de uma agitação suave foram incubadas a 25°C durante 10 minutos, seguido de 37°C durante 50 minutos. Para terminar a reação colocaram-se os tubos a 70°C durante 15 minutos. O cDNA foi, em seguida, armazenado a -20°C até à sua utilização. Quando a integridade do RNA estava comprometida devido a contaminação por DNA genómico, as amostras eram tratadas com DNase I antes de ser iniciada a síntese de cDNA. Neste caso adicionou-se a cada tubo 1-1.2 μg de RNA, 1 μL de tampão de reação 10x e 1 μL de DNase I, perfazendo-se com água estéril para um volume final de 10 μL e agitando suavemente. Em seguida, os tubos foram colocados no termociclador a 37°C durante 15 minutos, adicionou-se 1 μL de solução *stop* e colocou-se novamente no termociclador a 70°C durante 10 minutos e procedeu-se à síntese de cDNA.

4. Amplificação enzimática de DNA

A amplificação enzimática de DNA por RT-PCR foi utilizada para analisar a expressão dos seguintes genes da via de sinalização do paladar: *Tas1R1*, *Tas1R2*, *Tas1R3*, *Tas2R40*, *Tas2R109*, *Gnb3*, *Gnat3*, *AC4*, *PICB2*, *Itpr3*, *Scnn1g* e *TrpM5*. Neste procedimento foi utilizado o kit de PCR *KAPA2G Fast ReadyMix* (KAPABIOSYSTEMS), em conformidade com as recomendações do fabricante. Resumidamente, para cada reação adicionaram-se 5 µL de enzima *KAPA2G Fast ReadyMix with dye 2x*, 0.3 µL do *primer forward* (10 µM), 0.3 µL do *primer reverse* (10 µM) e 1 µL de cDNA de CPs ou 1 µL de água estéril para os controlos, perfazendo-se o volume final de 10 µL com água estéril. Os *primers* foram desenhados através do programa *Primer-Blast*. O programa de PCR consistiu numa desnaturação inicial a 95 °C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 10 segundos, 10 segundos à temperatura de *annealing* (Tabela 1) e 3 segundos a 72 °C, e por fim 1 minuto a 72°C. O resultado das reações de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2% na presença de *GreenSafe*, como descrito anteriormente. Para isso, foram depositados 5 µL de marcador de peso molecular *GRS Ladder 50 pb* (*Grisp*) em paralelo com 10 µL de cada uma das amostras. Após visualização no transiluminador, os produtos PCR devidamente amplificados foram purificados e enviados para sequenciação enzimática à empresa StabVida (Portugal). As sequências correspondentes aos genes em estudo foram comparadas pela utilização do programa NCBI-BLAST, com as sequências das bases de dados de *Rattus norvegicus*.

Tabela 1 - Sequências dos *primers* e condições de amplificação dos genes utilizados neste estudo.

Gene	Número de acesso	Tamanho do fragmento (bp)	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)		<i>Primer 5'-3'</i>
<i>AC4</i>	NM_019285	169	60	Fw	TGGAGTCATCGGGCTACAGA
				Rv	TCGATGCTCCATGTCTGCTC
<i>Gnat3</i>	NM_173139	141	62	Fw	GACGCCTCAGTTGGCTGAAA
				Rv	CCAGGGGCTGTGAGTCTATC
<i>Gnb3</i>	NM_021858	188	60	Fw	ATGTGAGGGAAGGGACCTGT
				Rv	CGTGATGCCACAGATGATGC
<i>Itpr3</i>	NM_013138	119	60	Fw	CGAGGTGGAACCTTCGTGA
				Rv	AAATCAGCTCCTGGGTGACG
<i>PICB2</i>	NM_053478	181	60	Fw	AGCAGTTCAACCCCTTCTCG
				Rv	GCAGTAGGTGACAGCTTGTT
<i>Scnn1g</i>	NM_017046	143	60	Fw	CACTGGAGCCAAGGTGCTTA
				Rv	ACTGGCTGTAAGGTTGCTC
<i>TrpM5</i>	NM_001191896	102	60	Fw	ATTTTCCGCCGTGTGCTCTA
				Rv	CAACGGGTGAAGAGAGCAGT
<i>Tas1R1</i>	NM_053305	186	61	Fw	CTGTTCTCCCTCCATGGTGAC
				Rv	GTCGTACAGCTCATACCCAG
<i>Tas1R2</i>	XM_003750067.1	182	55	Fw	CCTCCATGCCAACGTGAAGA
				Rv	CATCCACCATCTCGTAGCCG
<i>Tas1R3</i>	NM_130818	120	60	Fw	GCTATGACTGTGTGGACTGC
				Rv	TGCGAGGTAAGCAGGTTGTG
<i>Tas2R40</i>	NM_001025150	100	58	Fw	CGCGTGGCTCAATGTCTTCT
				Rv	GAGCCGAGGCATCAACTACT
<i>Tas2R109</i>	NM_001080939	126	60	Fw	CTGGTGTGCTGGTCTTACT
				Rv	GCAGTCTGCACGGTAATGGT

5. PCR em Tempo Real da transcrição reversa

A quantificação da expressão relativa de alguns dos genes em estudo, nomeadamente *TrpM5*, *PlcB2*, *Tas1R1* e *Tas2R109*, foi realizada através da técnica de RT-qPCR. Neste procedimento foi utilizado o kit *KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2×) Universal (KAPABIOSYSTEMS)*, seguindo as instruções do fabricante. Numa primeira fase as condições foram otimizadas testando a eficiência dos *primers* para cada um dos genes com 4 diluições de cDNA: 1:1 (*stock*), 1:5, 1:25, 1:125. Para cada reação foram adicionados 7.5 µL de *SYBR Green (KAPABIOSYSTEMS)*, 0.225 µL de *primer forward* (10 µM), 0.225 µL de *primer reverse* (10 µM) e 1 µL de cDNA nas diferentes diluições para cada um dos genes, perfazendo-se com água estéril até um volume final de 15 µL. As condições de amplificação utilizadas foram 95°C durante 3 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos num termociclador *CFX Connect™ Real Time System (Bio-Rad)*. Para normalizar os níveis de expressão dos genes foi utilizado como controlo o gene endógeno *Ciclofilina A*. Depois de cada ciclo, a emissão de fluorescência do *SYBR Green* foi determinada e a quantidade relativa de cada RNA foi quantificada pelo software *Bio-Rad CFX Manager*. Os perfis da curva de *melting*, gerados no final de cada reação, confirmaram a amplificação de um produto específico. Além disso, estas curvas permitiram avaliar a formação de dímeros de *primers* e a pureza do produto amplificado. Numa segunda fase, já depois do procedimento otimizado para cada um dos genes, procedeu-se à realização das experiências como referido anteriormente nos pontos 1.1.1 e 1.1.2. A análise dos dados recolhidos a partir da experiência de RT-qPCR foi realizada utilizando o modelo matemático proposto por Pfaffl (Pfaffl, 2001), que permitiu analisar diferenças de expressão entre explantes de CP tratados com o respetivo estímulo e o controlo, tendo em conta a normalização para o gene endógeno.

6. Análise Estatística

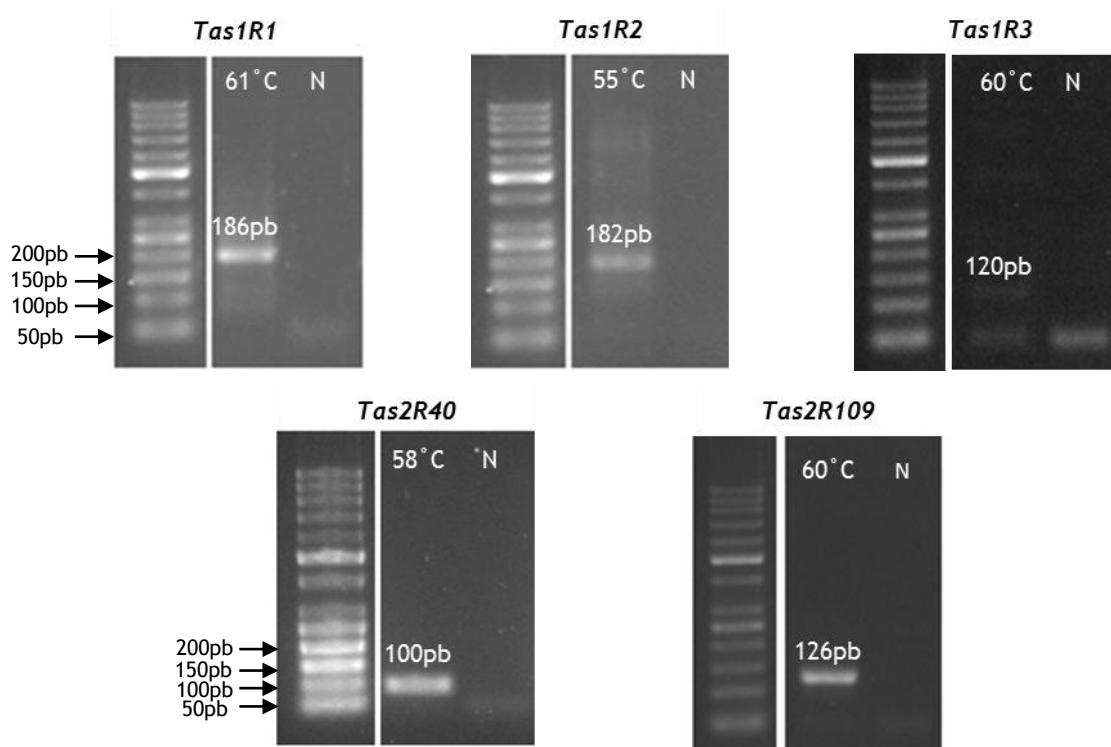
A análise estatística foi realizada com o programa *GraphPad Prism* (versão 6). Para a comparação das médias entre três ou mais grupos foi utilizado o teste *one-way ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett* e para a comparação das médias entre dois grupos foi utilizado o *t-test*, sendo que os dados foram expressos em média ± SEM. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$.

IV. Resultados

1. Expressão dos genes da via de sinalização do paladar no plexo coróide de rato

1.1. Amplificação enzimática da transcrição reversa (RT-PCR)

Tendo o presente trabalho como objetivo principal a análise do efeito do E2 e do BPA na regulação via de transdução do paladar no CP, começamos por verificar a expressão de cada um dos genes em causa no CP. Para isso, preparou-se RNA total de CPs de ratos recém-nascidos, realizou-se transcrição reversa e utilizou-se o cDNA para amplificação enzimática com *primers* específicos para cada um dos genes (Tabela 1). Os resultados de RT-PCR permitiram confirmar a expressão do mRNA dos genes da via de sinalização do paladar. Encontraram-se transcritos de alguns dos recetores do paladar (*Tas1R1*, *Tas1R2*, *Tas1R3*, *Tas2R40* e *Tas2R109*) e de genes que codificam para proteínas efetoras desta via de sinalização (*Gnb3*, *Gnat3*, *AC4*, *PLCB2*, *Itpr3*, *Scnn1g* e *TrpM5*). Os produtos de amplificação do cDNA, foram analisados numa eletroforese em gel de agarose a 2% corado com *GreenSafe*, confirmando-se os tamanhos dos fragmentos por comparação com as bandas do marcador de peso molecular (Figura 7).



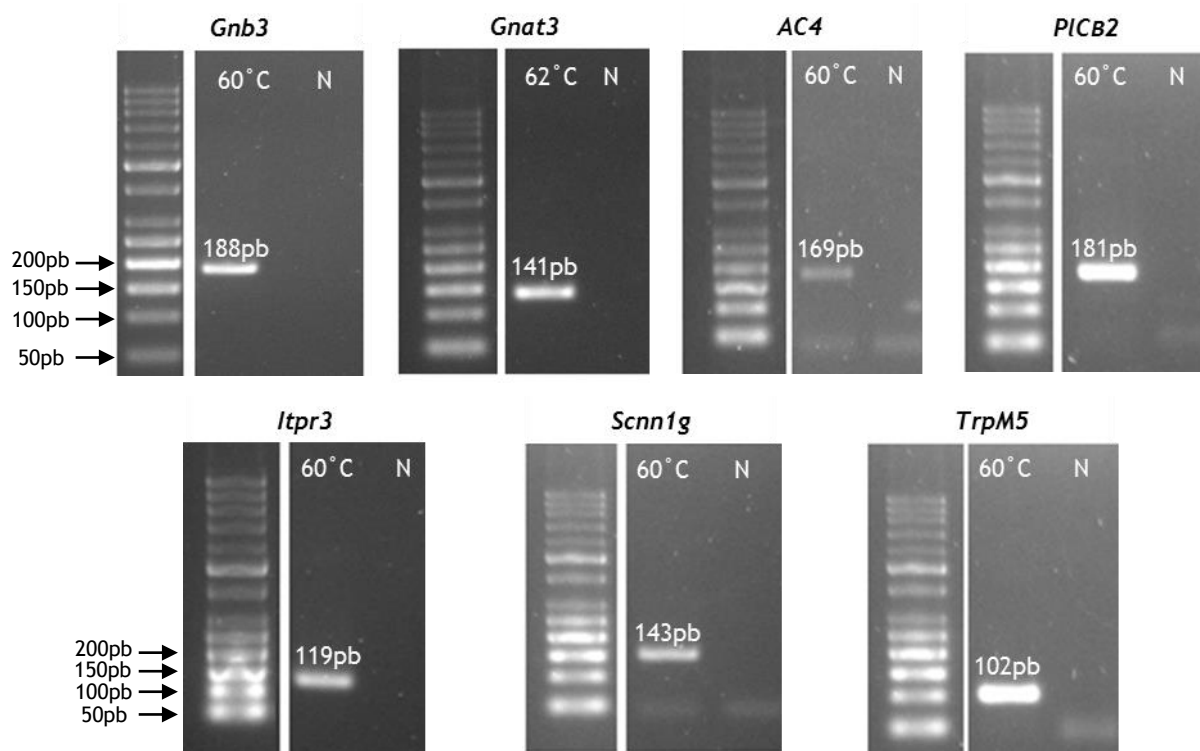


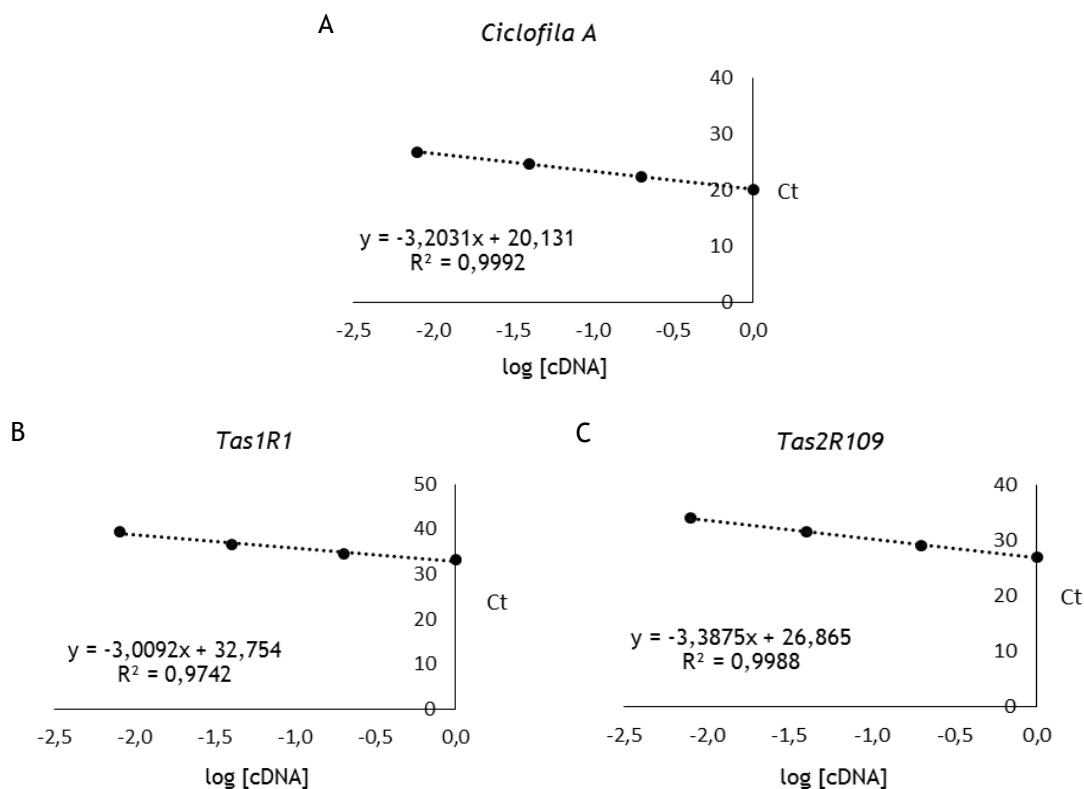
Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose a 2% corada com *GreenSafe* de 10 μ L de cada um dos produtos de PCR, realizado com cDNA de CP, e *primers* específicos dos genes da via de sinalização do paladar. Em cada uma das imagens encontra-se representado (da esquerda para a direita) o marcador de peso molecular (*GRS Ladder* 50 pb), o fragmento relativo a cada gene com a respetiva temperatura ótima de *annealing* e o controlo negativo (N), sem cDNA.

Como ilustrado na figura 7, obtiveram-se produtos de amplificação com os tamanhos previstos: 186 bp, 182 pb, 120 pb, 100 bp, 126 bp, 188 bp, 141 bp, 169 bp, 181 bp, 119 bp, 143 bp e 102 bp respetivamente para os genes *Tas1R1*, *Tas1R2*, *Tas1R3*, *Tas2R40*, *Tas2R109*, *Gnb3*, *Gnat3*, *AC4*, *PlcB2*, *Itpr3*, *Scnn1g* e *TrpM5*. Como se pode ver na figura, nos controlos negativos não se observou amplificação, indicando ausência de contaminação com DNA exógeno. Os produtos amplificados foram ainda sequenciados pelo método de Sanger, pela empresa StabVida (Portugal) e as sequências correspondentes foram analisadas através da ferramenta informática NCBI-BLAST, por comparação com as sequências da base de dados de *Rattus norvegicus*. O alinhamento das nossas sequências com as sequências da base de dados revelou uma homologia superior a 97%.

2. Efeito do E2 e do BPA na expressão dos genes da via de transdução do paladar

2.1. Otimização das condições de PCR em tempo real do produto da transcrição reversa (RT-qPCR)

De forma a responder aos objetivos delineados, foram selecionados quatro genes da via de sinalização do paladar para serem estudados por RT-qPCR: *Tas1R1*, *Tas2R109*, *PlcB2* e *TrpM5*. Uma vez que nenhum dos genes tinha sido previamente estudado por RT-qPCR, antes de serem iniciadas as experiências com estímulos, procedeu-se a otimizações das condições de reação de PCR. Utilizou-se como controlo endógeno o gene da *Ciclofilina A*, para normalizar os níveis de expressão dos genes em estudo, e fizeram-se experiências de otimização de eficiência de reação para cada um dos genes em estudo, pelo método de série de diluições, utilizando-se 4 diluições de um cDNA de CP. Obtiveram-se as retas log [cDNA] vs. Ct, na figura 8, que apresentam valores de declive (k) dentro dos intervalos de referência ($-3.93 < k < -2.92$), o que corresponde a valores de eficiência de reação entre 90 e 110%. No processo de otimização, a especificidade dos *primers* e a possibilidade de formação de dímeros de *primers* foi eliminada através da análise das curvas de *melting* e realizaram-se sempre poços controlo onde não se colocou cDNA, para excluir a possibilidade de alguma contaminação.



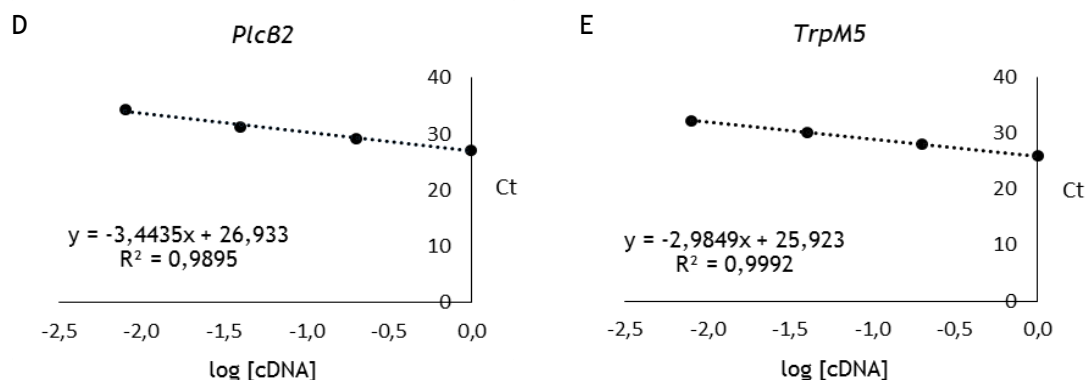


Figura 8 - Retas log [cDNA] vs. Ct para o cálculo de eficiência de reação de RT-qPCR (método série de diluição) dos genes em estudo. (A) *Ciclofilina A*, (B) *Tas1R1*, (C) *Tas2R109*, (D) *PlcB2* e (E) *TrpM5*.

2.2. Efeito do E2 na via de transdução do paladar

O estudo do efeito do E2 na expressão dos genes da via do paladar foi efetuado por ensaios *ex vivo* em CPs de ratos recém-nascidos, por aplicação de estímulos com diferentes concentrações de hormona (0.1, 1, 10 e 100 nM).

Procedeu-se a um primeiro ensaio para avaliar se os veículos utilizados (DMSO e EtOH), às concentrações das experiências, tinham algum tipo de interferência na expressão dos genes em estudo. Na figura 9 estão representados os resultados obtidos, mostrando que os veículos DMSO e EtOH não provocam diferenças de expressão relativamente ao controlo (CPs não tratados).

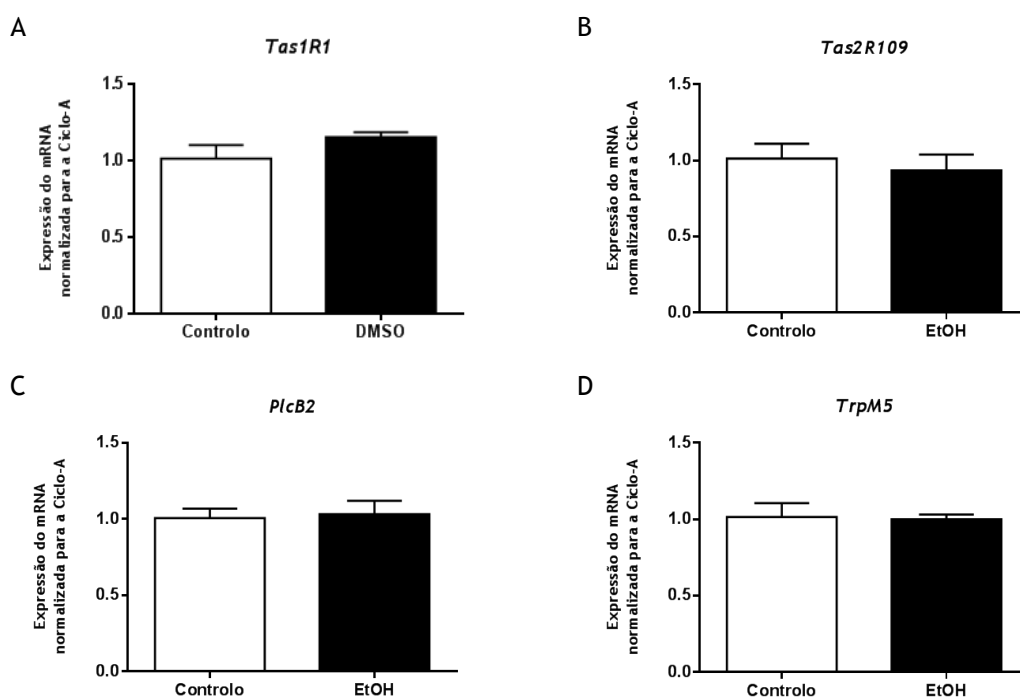


Figura 9 - Efeito dos veículos (0.002% DMSO e 0.002% EtOH) na expressão dos genes da via de transdução do paladar, em CP de ratos *Wistar Han* recém-nascidos. RT-qPCR foi realizado a partir do cDNA de CPs tratados durante 6h com 0.002% de DMSO para o (A) *Tas1R1* e 0.002% de EtOH para o (B) *Tas2R109*, a (C) *PlcB2* e o (D) *TrpM5*. *t-test* foi usado para a análise estatística entre o controlo (0 nM) e a condição de veículo. Os gráficos de barras representam médias \pm SEM com um $n \geq 3$.

Efeito do Estradiol e do Desregulador Endócrino Bisfenol-A na Via do Paladar do Plexo Coroide

Os ensaios do E2 foram então analisados tendo-se utilizado cinco condições distintas: um controlo (veículo) e as condições correspondentes a quatro concentrações de E2 (0.1, 1, 10, 100 nM). Como se pode ver na figura 10, onde estão representados os níveis de expressão génica normalizada com a *Ciclofilina A*, verificou-se uma diminuição dos níveis de expressão de todos os genes com o aumento da concentração de E2 (1, 10 e 100 nM), não havendo diferenças com significado estatístico à concentração de E2 mais baixa (0.1 nM).

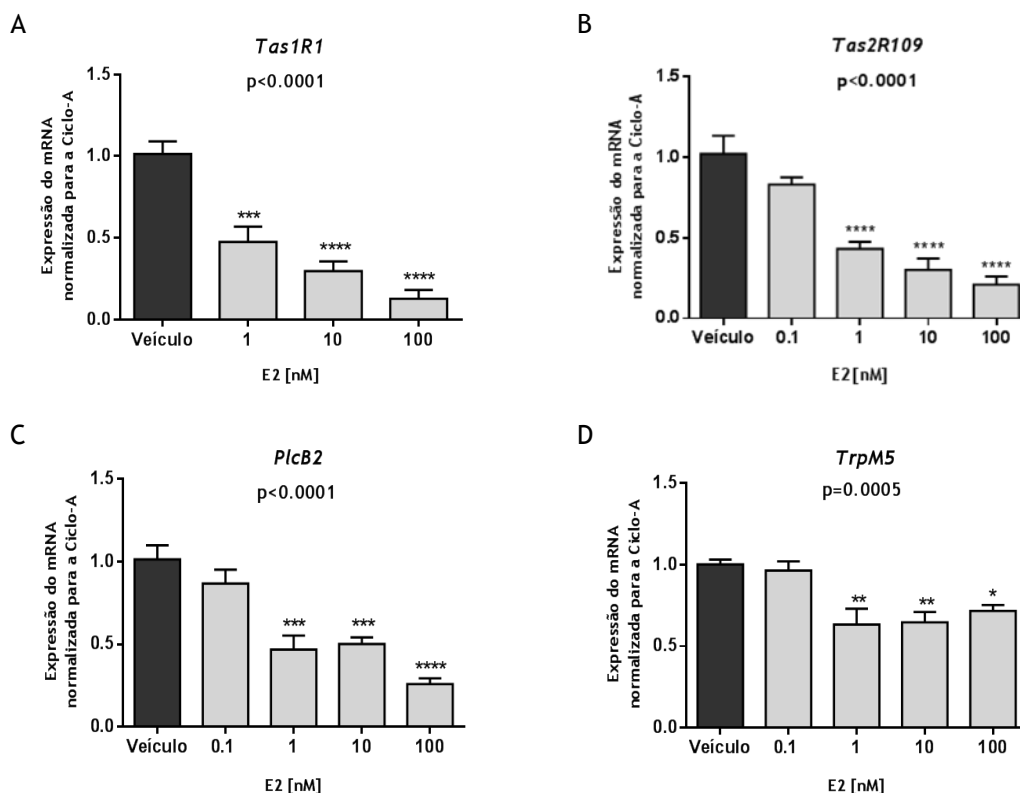


Figura 10 - Efeitos do E2 sobre os níveis de expressão dos genes da via de sinalização do paladar. RT-qPCR foi usado para analisar a expressão do (A) *Tas1R1*, (B) *Tas2R109*, (C) *PlcB2* e (D) *TrpM5* em explantes de CP de ratos *Wistar Han* recém-nascidos tratados durante 6 h com E2 a diferentes concentrações (0.1, 1, 10 e 100 nM). *One-way ANOVA* seguido por teste de *Dunnnett* foi usado para a análise estatística relativamente ao veículo (controlo, 0.002% de EtOH para o *Tas2R109*, a *PlcB2* e o *TrpM5* e 0.002% de DMSO para o *Tas1R1*). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$ e os gráficos de barras representam médias \pm SEM com um $n \geq 3$.

Numa tentativa de esclarecer o mecanismo molecular envolvido neste efeito, procedeu-se à análise da expressão génica quando sujeitos a um pré tratamento com ICI, um antagonista dos receptores de estrogénio. Para isso, foram utilizadas quatro condições distintas: um controlo (veículo), um estímulo de E2 na concentração mais baixa em que tinha sido obtido significado estatístico na experiência anterior (1 nM), uma condição apenas com o ICI e uma condição na mesma concentração de E2 com um pré tratamento de 100 nM de ICI. Na figura 11 estão representados os resultados correspondentes à expressão normalizada dos genes em estudo, quando sujeitos ao pré tratamento com ICI. Verificou-se que o estímulo de 1 nM de E2 diminuiu a expressão de todos os genes, e quando os CPs são sujeitos a um tratamento prévio com ICI, esse efeito do E2 é anulado. Nos controlos só com ICI, não se observa qualquer efeito.

Efeito do Estradiol e do Desregulador Endócrino Bisfenol-A na Via do Paladar do Plexo Coroide

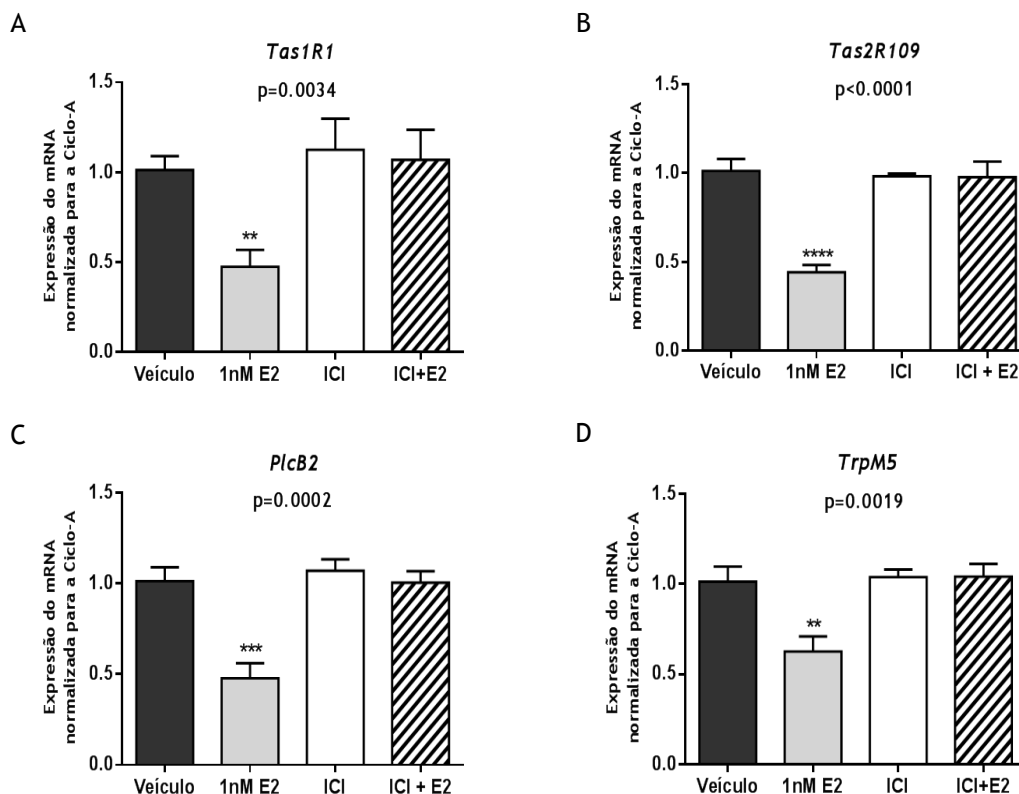
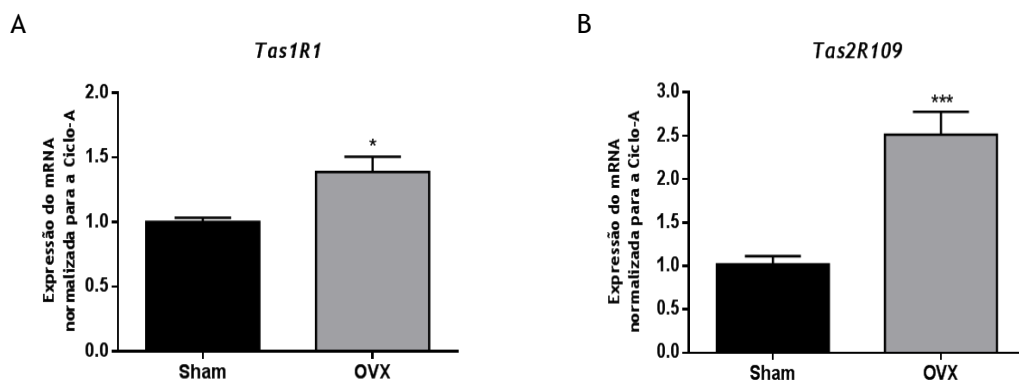


Figura 11 - Ensaios com ICI para esclarecimento do mecanismo molecular de atuação do E2 sobre os níveis de expressão dos genes da via de sinalização do paladar. RT-qPCR foi usado para analisar a expressão relativa do (A) *Tas1R1*, (B) *Tas2R109*, (C) *PlcB2* e (D) *TrpM5* em explantes de CP de ratos *Wistar Han* recém-nascidos com um pré-tratamento de 90 minutos com ICI (100 nM). *One-way ANOVA* seguido por teste de *Dunnett* foi usado para a análise estatística relativamente ao veículo (controle, 0.002% de EtOH para o *Tas2R109*, a *PlcB2* e o *TrpM5* e 0.002% de DMSO para o *Tas1R1*). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$ e os gráficos de barras representam médias \pm SEM com um $n \geq 3$.

Realizámos ainda estudos *in vivo*, numa experiência em ratos fêmeas com 2 meses de idade, onde se comparou a expressão génica, do mesmo grupo de genes da via do paladar, em CPs de ratos *Sham* e de ratos *OVX*, utilizando novamente o RT-qPCR. Na figura 12 encontram-se representados os resultados referentes a este estudo, mostrando que nos ratos *OVX* há o aumento da expressão em todos os genes estudados, relativamente aos *Sham*.



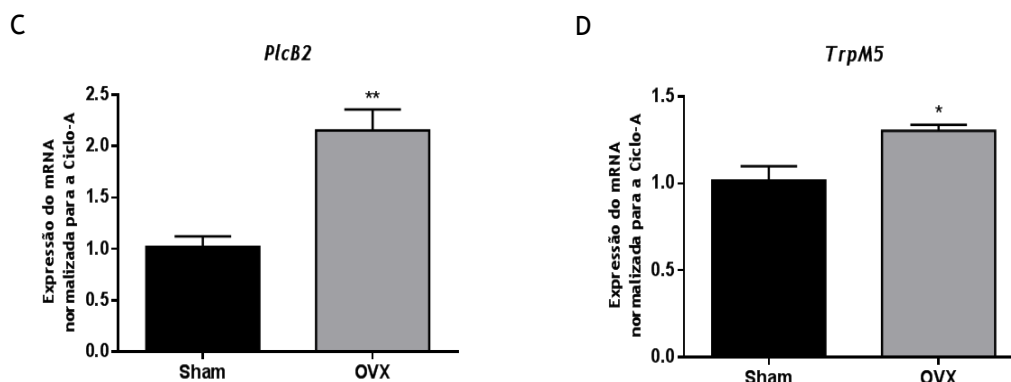


Figura 12 - Análise dos níveis de expressão do mRNA, por RT-qPCR, dos genes da via de sinalização do paladar, no CP de ratos fêmea *Wistar Han* com 2 meses de idade *Sham* (controle) e OVX. (A) *Tas1R1*, (B) *Tas2R109*, (C) *PlcB2* e (D) *TrpM5*. *t-test* foi usado para a análise estatística. Os gráficos de barras representam médias \pm SEM com um $n \geq 3$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

No sentido de corroborar e discutir os nossos resultados de expressão relativa OVX vs *Sham* [calculados pelo métodos de Pfaffl (Pfaffl, 2001)], confrontámo-los com os resultados do ensaio de *microarrays* transcritômicos (Quintela et al., 2013) (Tabela 2). Os resultados dos dois estudos mostraram-se concordantes para os genes *Tas1R1* e para a *PlcB2*. Em relação ao *Tas2R109*, observaram-se diferentes valores de expressão relativa, mas com a mesma tendência: o aumento de expressão observado neste estudo (2.47) foi superior ao obtido nos *microarrays* (1.49). No caso do *TrpM5* obtivemos um pequeno aumento nos níveis de expressão (1.3), que não tinha sido detetado no estudo de *microarrays*.

Tabela 2 - Comparação dos resultados da expressão relativa dos estudos de *microarrays* transcritômicos e do RT-qPCR para os genes da via de sinalização do paladar no CP de ratos OVX, quando comparados com os de ratos *Sham*.

Gene	<i>Tas1R1</i>	<i>PICB2</i>	<i>Tas2R109</i>	<i>TrpM5</i>
<i>Microarrays</i>	1.42	1.89	1.49	—
RT-qPCR	1.39	2.13	2.47	1.30

2.3. Efeito do BPA na via de transdução do paladar

O efeito do BPA na expressão dos genes da via do paladar também foi avaliado em explantes de CP de ratos recém-nascidos, por RT-qPCR, mas apenas em dois dos genes, no *Tas1R1* e no *TrpM5*.

Tal como para o estudo do E2, procedeu-se a uma primeira experiência para avaliar os efeitos do veículo (DMSO). Na figura 13 estão representados os resultados obtidos, que mostram que o tratamento com DMSO, às concentrações usadas na experiência, não apresenta diferenças com significado estatístico.

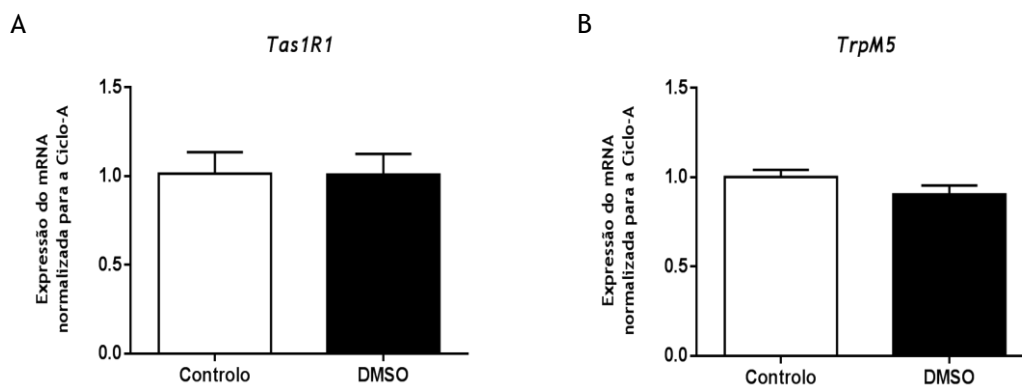


Figura 13 - Efeito do veículo (1% DMSO), nos níveis de expressão do *Tas1R1* e *TrpM5*, em CP de ratos *Wistar Han* recém-nascidos. RT-qPCR foi realizado a partir do cDNA de CPs tratados durante 6h com 1% de DMSO para o (A) *Tas1R1* e o (B) *TrpM5*. *t-test* foi usado para a análise estatística entre o controlo (0 nM) e a condição de veículo. Os gráficos de barras representam médias \pm SEM com um $n \geq 3$.

O efeito do BPA na expressão dos genes *Tas1R1* e *TrpM5* foi analisado em seis condições distintas: um controlo (veículo) e cinco concentrações de BPA (10, 25, 50, 75 e 100 nM), estando representados os resultados na figura 14. Verificou-se um efeito na expressão dos genes em curva de dose-resposta não monotónica, havendo diferenças com significado estatístico na concentração 10 nM no caso do *Tas1R1* e nas concentrações 10, 25 e 75 nM no caso do *TrpM5*.

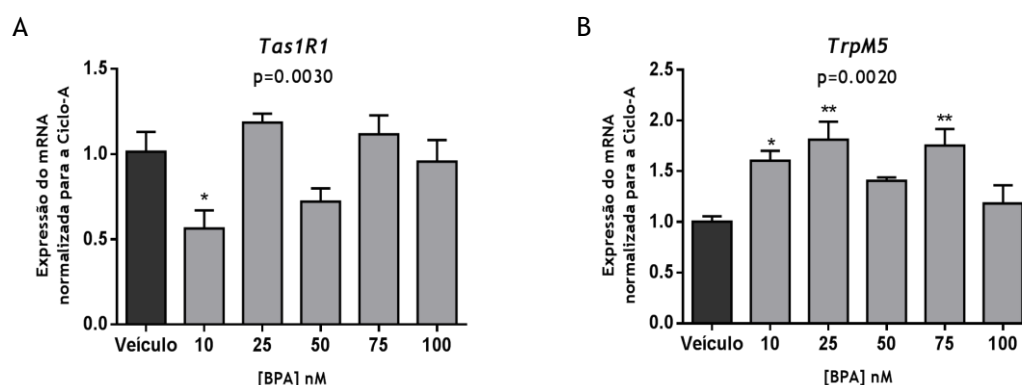


Figura 14 - Efeitos do BPA sobre os níveis de expressão dos genes da via de sinalização do paladar. RT-qPCR foi usado para analisar a expressão do (A) *Tas1R1* e (B) *TrpM5* em explantes de CP de ratos *Wistar Han* recém-nascidos tratados durante 6 h com BPA a diferentes concentrações (10, 25, 50, 75 e 100 nM). *One-way ANOVA* seguido por teste de *Dunnnett* foi usado para a análise estatística relativamente ao veículo (controlo, 1% de DMSO). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$ e os gráficos de barras representam médias \pm SEM com um $n \geq 3$.

V. Discussão

O CP, localizado no sistema ventricular cerebral, é uma das principais fontes do CSF e forma a barreira sangue-CSF, que é responsável por controlar a composição do CSF, participando assim na homeostasia do SNC (Bill and Korzh, 2014, Brown et al., 2004, Liddelow, 2015, Lun et al., 2015). Um estudo de *microarrays* transcritômicos, realizado previamente pelo nosso grupo de investigação, mostrou que existem várias vias de sinalização que são reguladas pelas hormonas sexuais no CP de rato, entre as quais a via de transdução de sinal do paladar (Quintela et al., 2013). Esta via de transdução, descoberta pela primeira vez na cavidade oral, deteta diferentes tipos de moléculas, avaliando assim o teor nutritivo dos alimentos e prevenindo a ingestão de substâncias tóxicas (Chandrashekar et al., 2006). Vários estudos têm demonstrado a expressão de componentes da via de sinalização do paladar noutros tecidos para além da cavidade oral, como no trato gastrointestinal (Hass et al., 2010, Jang et al., 2007, Wu et al., 2002), nos testículos (Xu et al., 2013), nos espermatozoides (Fehr et al., 2007, Li and Zhou, 2012, Meyer et al., 2012), nas vias respiratórias (Deshpande et al., 2010, Shah et al., 2009, Tizzano et al., 2011), no pâncreas (Nakagawa et al., 2009, Oya et al., 2011), no coração (Foster et al., 2013), nos rins (Liu et al., 2015), na tiroide (Clark et al., 2015), na pele (Wolfle et al., 2015), no cérebro (Ren et al., 2009, Singh et al., 2011) e no CP (Ren et al., 2009, Gonçalves I, comunicação pessoal).

Sabendo que a via de transdução do paladar, na cavidade oral, deteta os diferentes sabores e compostos tóxicos, são também conhecidas algumas funções noutros tecidos tais como, a produção de óxido nítrico para efeitos antimicrobianos nas vias respiratórias (Lee et al., 2012), a regulação dos níveis de glucose no cérebro (Ren et al., 2009, Singh et al., 2011), a secreção do GLP-1 e do péptido YY (PYY) no intestino (Steinert et al., 2011) e o controlo do desenvolvimento e maturação dos espermatozoides (Mosinger et al., 2013). Levantámos então a hipótese de, no CP, esta via poder detetar compostos tóxicos no CSF e ativar um sistema de eliminação, contribuindo para a proteção do SNC. Assim, o estudo da expressão e regulação da via do paladar no CP de rato parece ser de maior relevância, podendo contribuir para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos nesta função quimiosensorial do CP.

Embora, de uma forma pouco clara, um estudo de hibridação *in situ* realizado por outros autores em cérebros de ratinhos, identificou a expressão de alguns dos genes recetores do paladar *Tas1R2* e *Tas1R3* (Ren et al., 2009), nas células epiteliais de CP. Mais recentemente, no nosso grupo de investigação, a expressão de recetores (*Tas1R1*, *Tas1R2*, *Tas1R3*, *Tas2R40* e *Tas2R109*) e de efetores (*Gnb3*, *Gnat3*, *AC4*, *PLCB2*, *Itpr3*, *Scnn1g* e *TrpM5*) da via de sinalização do paladar foi demonstrada nas CPEC tanto ao nível de RNA como de proteína (Gonçalves I, comunicação pessoal). Tendo o presente trabalho como objetivo a análise do efeito do E2 e do BPA na via de sinalização do paladar, começamos por testar os explantes de CP de rato recém-nascido como modelo de estudo. Confirmámos por RT-PCR a expressão dos genes da via de sinalização do paladar (*Tas1R1*, *Tas1R2*, *Tas1R3*, *Tas2R40*, *Tas2R109*, *Gnb3*, *Gnat3*, *AC4*, *PLCB2*, *Itpr3*, *Scnn1g* e *TrpM5*) nos explantes de CP de rato recém-nascido. A análise prévia de *microarrays* transcritômicos, no CP de ratos (2 meses de idade) fêmeas e machos, OVX e OOX (orquidectomizados), tinha revelado que o declínio dos níveis de hormonas provoca um aumento

na expressão de alguns dos genes da via, nomeadamente nos recetores e na *PlcB2* (Quintela et al., 2013). Assim, de forma a esclarecer e validar este resultado, selecionámos quatro genes da via de sinalização do paladar para serem estudados por RT-qPCR: os GPCRs, *Tas1R1* e *Tas2R109*, que são responsáveis respetivamente pelo reconhecimento do sabor *umami* e amargo, e a *PlcB2* e o *TrpM5* que são moléculas efetoras da via de sinalização (Cygankiewicz et al., 2014).

Começamos por realizar ensaios para avaliar se os veículos às concentrações utilizadas interferiam na expressão génica. Verificámos que o EtOH 0.002% não provoca qualquer tipo de interferência na expressão do *Tas2R109*, da *PlcB2* e do *TrpM5*, o que não aconteceu com o *Tas1R1*, tendo sido por isso utilizado como veículo nas experiências para este gene 0.002% de DMSO. Analisámos então a expressão relativa dos quatro genes, em explantes do CP de ratos recém-nascidos estimulados com concentrações crescentes de E2 (0.1, 1, 10 e 100 nM; experiência *ex vivo*). Na análise da expressão do *Tas1R1*, não se estudou a concentração mais baixa de E2 (0.1 nM) porque nos outros três genes esta dose não tinha mostrado diferenças com significado estatístico. Observámos que o E2 regula negativamente a expressão génica, sendo que estes resultados, no caso dos genes *Tas1R1*, *Tas2R109* e *PlcB2*, vieram corroborar os resultados do estudo de *microarrays*, que tinham revelado uma indução na expressão génica quando os animais sofreram um declínio hormonal por ovariectomia ou orquiectomia. No caso do gene *TrpM5* observámos que o E2 regula negativamente a sua expressão, efeito que não tinha sido detetado no estudo de *microarrays* transcritómicos. Uma vez que o CP expressa recetores nucleares hormonais, os ERs, e já tinha sido mostrado que corresponde a um tecido alvo das hormonas esteroides (Hong-Goka and Chang, 2004, Quintela et al., 2009), procedemos também à análise da expressão dos mesmos genes quando sujeitos a um pré tratamento com ICI, um antagonista dos ERs. Verificámos que o ICI bloqueia o efeito do E2, o que sugere que o mecanismo molecular de atuação do E2 se faz via ERs. Alargámos ainda o nosso estudo com uma experiência *in vivo*, onde observámos que nos ratos OVX há o aumento da expressão de todos os genes em relação ao controlo, resultados esses que conseguem validar os dos *microarrays* para o *Tas1R1*, o *Tas2R109* e a *PlcB2*. Tal como no estudo *ex vivo*, o gene *TrpM5* mostra pequenas diferenças de expressão, não detetadas no estudo de *microarrays*. Os resultados são concordantes para o *Tas1R1* e para a *PlcB2*. No caso do *Tas2R109*, observa-se a mesma tendência, mas o aumento de expressão observada por RT-qPCR foi superior ao obtido nos *microarrays*. Esta discordância pode dever-se simplesmente às diferenças nos desenhos experimentais e na sensibilidade das metodologias utilizadas (*microarrays* vs RT-qPCR).

Noutros estudos centrados no CP, foi demonstrado que as hormonas sexuais regulam mecanismos relacionados com a sua função. Foi demonstrado que o E2 e a progesterona induzem a expressão da TTR no CP de rato, respetivamente através de uma via dependente de ERs e do recetor de progesterona, podendo participar na diminuição da agregação do péptido beta amiloide e consequentemente reduzir o risco da doença de *Alzheimer* (Quintela et al., 2009, Quintela et al., 2011, Tang et al., 2004). O estudo transcritómico do CP mostrou também que a via de sinalização do olfato, a via do metabolismo e da biossíntese de hormonas esteroides e o ritmo circadiano são reguladas pelas hormonas sexuais, contribuindo para uma regulação

eficiente da homeostasia do SNC e da composição do CSF (Quintela et al., 2013). Todos estes dados, em conjunto com os do presente estudo são indicativos de que as hormonas sexuais podem ter um mecanismo protetor no CP através da regulação de diversas vias de sinalização que poderão funcionar como alvos terapêuticos para prevenir ou retardar doenças do SNC.

O nosso estudo centrou-se ainda na análise do efeito do BPA na expressão de dois genes da via do paladar (*Tas1R1* e *TrpM5*). O BPA é um composto que interfere com algumas funções do sistema endócrino e, a exposição crónica ao BPA, mesmo a doses baixas, pode ter efeitos adversos (Mikolajewska et al., 2015). Este composto estrogénico atua como um DE que mimetiza as hormonas endógenas e tem a capacidade de se ligar aos ERs (Mileva et al., 2014). Devido à sua elevada produção e aplicação em produtos de uso diário, vários estudos têm sido realizados para relatar os possíveis efeitos adversos do BPA para a saúde, como os seus riscos para a função cerebral, uma vez que é um composto lipofílico capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (Gentilcore et al., 2013, MacLusky et al., 2005, Miyatake et al., 2006, Sun et al., 2002). Contudo, não existem ainda na literatura estudos dos efeitos do BPA no CP, surgindo assim a relevância do presente estudo. Tal como nas experiências realizadas com estímulos de E2, começamos com ensaios para avaliar se o veículo (1% de DMSO) interferia na expressão génica. Verificámos que não havia qualquer tipo de interferência na expressão do *Tas1R1* e do *TrpM5*. Os estímulos de BPA (10, 25, 50, 75 e 100 nM; experiência *ex vivo*) mostraram que este DE afeta a expressão destes genes, sendo que esta demonstra uma curva de dose-resposta não monotónica, característica dos DE (Mileva et al., 2014). Os efeitos observados com a concentração mais baixa de BPA (10 nM), foram distintos nos dois genes, uma diminuição no *Tas1R1* e um aumento no *TrpM5*. Na expressão do *TrpM5* ainda se verificou um aumento significativo com as concentrações de 25 e 75 nM de BPA. A regulação destes genes pelo BPA poderá estar associada à sua capacidade para mimetizar as ações do E2 mas também à ativação de outras vias diferentes que não interferem com a expressão dos genes. Assim, embora ainda bastante preliminares, os resultados do efeito do BPA na regulação da via de sinalização do paladar no CP são da máxima relevância, pois poderão contribuir para a compreensão do papel do CP nos mecanismos de destoxificação do SNC, que podem estar alterados nalgumas patologias do SNC.

VI. Conclusão e Perspetivas Futuras

A realização deste trabalho permitiu confirmar a expressão da via de transdução do paladar no CP de rato e que alguns dos genes desta via são regulados pelas hormonas sexuais, tanto *ex vivo*, quando os CPs são sujeitos a estímulos com E2, como *in vivo*, quando há declínio dos níveis hormonais das fêmeas OVX. Para além disso, o estudo com ICI nos explantes de CP, permitiu esclarecer o mecanismo molecular do efeito do E2 na regulação génica da via do paladar, indicando o envolvimento dos ERs. Por outro lado, verificou-se também que o BPA tem efeitos na expressão de dois componentes da via de sinalização do paladar. Este efeito do BPA pode dever-se à sua capacidade de mimetizar as ações do E2. Assim, estes resultados sugerem que a via de sinalização do paladar no CP é regulada não só por hormonas endógenas, mas também por compostos exógenos, tais como BPA. Deste modo, podemos afirmar que *background* hormonal e a exposição ambiental ao BPA podem interferir com a expressão dos componentes da via de sinalização do paladar, podendo afetar a função quimiosensorial do CP na vigilância do CSF. A via de sinalização do paladar, no CP, poderá estar envolvida na deteção da composição do CSF, reconhecendo por exemplo neuropeptídeos ou moléculas tóxicas, tanto em situações fisiológicas como patológicas, funcionando como um sistema de alerta e de proteção do SNC, que poderá estar alterado nalgumas patologias do SNC, nomeadamente em doenças neurodegenerativas.

Futuramente, para consolidar este trabalho, pretende-se alargar o estudo hormonal no CP aos componentes da via de sinalização do paladar que não foram analisados. Em relação ao efeito do BPA, a análise da expressão dos restantes componentes da via do paladar deverá ser realizada, bem como o estudo com um antagonista dos ERs para avaliar se o BPA atua no CP via ER. Também seria interessante proceder a estudos *in vivo* com o BPA e complementar todos estes ensaios com análises da expressão proteica.

VII. Referências Bibliográficas

- ALONSO-MAGDALENA, P., ROPERO, A. B., SORIANO, S., GARCIA-AREVALO, M., RIPOLL, C., FUENTES, E., QUESADA, I. & NADAL, A. 2012. Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 355: 201-207.
- BAULIEU, E. E. 1998. Neurosteroids: A novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology*, 23: 963-987.
- BAULIEU, E. E., ROBEL, P. & SCHUMACHER, M. 2001. Neurosteroids: Beginning of the story. *Neurosteroids and Brain Function*, 46: 1-32.
- BHANDARI, R. K., DEEM, S. L., HOLLIDAY, D. K., JANDEGIAN, C. M., KASSOTIS, C. D., NAGEL, S. C., TILLITT, D. E., SAAL, F. S. V. & ROSENFELD, C. S. 2015. Effects of the environmental estrogenic contaminants bisphenol A and 17 alpha-ethinyl estradiol on sexual development and adult behaviors in aquatic wildlife species. *General and Comparative Endocrinology*, 214: 195-219.
- BIEDERMANN, S., TSCHUDIN, P. & GROB, K. 2010. Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398: 571-576.
- BILL, B. R. & KORZH, V. 2014. Choroid plexus in developmental and evolutionary perspective. *Frontiers in Neuroscience*, 8: 1-11.
- BJÖRNSTRÖM, L. & SJÖBERG, M. 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: Convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular Endocrinology*, 19: 833-842.
- BOURQUE, M., DLUZEN, D. E. & DI PAOLO, T. 2009. Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30: 142-157.
- BROWN, P. D., DAVIES, S. L., SEAKE, T. & MILLAR, I. D. 2004. Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. *Neuroscience*, 129: 957-970.
- CALAFAT, A. M., YE, X. Y., WONG, L. Y., REIDY, J. A. & NEEDHAM, L. L. 2008. Exposure of the US population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environmental Health Perspectives*, 116: 39-44.
- CARROLL, J. C. & ROSARIO, E. R. 2012. The Potential Use of Hormone-Based Therapeutics for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, 9: 18-34.
- CASALS-CASAS, C. & DESVERGNE, B. 2011. Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption. *Annual Review of Physiology*, 73: 135-162.
- CHANDRASHEKAR, J., HOON, M. A., RYBA, N. J. P. & ZUKER, C. S. 2006. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, 444: 288-294.

- CHARALAMPOPOULOS, I., REMBOUTSIKA, E., MARGIORIS, A. N. & GRAVANIS, A. 2008. Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 19: 300-307.
- CHAUDHARI, N. & ROPER, S. D. 2010. The cell biology of taste. *Journal of Cell Biology*, 190: 285-296.
- CHODOBSKI, A. & SZMYDYNGER-CHODOBSKA, J. 2001. Choroid plexus: Target for polypeptides and site of their synthesis. *Microscopy Research and Technique*, 52: 65-82.
- CHRISTENSEN, H. L., NGUYEN, A. T., PEDERSEN, F. D. & DAMKIER, H. H. 2013. Na⁺ dependent acid-base transporters in the choroid plexus; insights from slc4 and slc9 gene deletion studies. *Frontiers in Physiology*, 4: 1-10.
- CLARK, A. A., DOTSON, C. D., ELSON, A. E. T., VOIGT, A., BOEHM, U., MEYERHOF, W., STEINLE, N. I. & MUNGER, S. D. 2015. TAS2R bitter taste receptors regulate thyroid function. *FASEB Journal*, 29: 164-172.
- CYGANKIEWICZ, A. I., MASLOWSKA, A. & KRAJEWSKA, W. M. 2014. Molecular Basis of Taste Sense: Involvement of GPCR Receptors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54: 771-780.
- DAMKIER, H. H., BROWN, P. D. & PRAETORIUS, J. 2010. Epithelial Pathways in Choroid Plexus Electrolyte Transport. *Physiology*, 25: 239-249.
- DAMKIER, H. H., BROWN, P. D. & PRAETORIUS, J. 2013. Cerebrospinal Fluid Secretion by the Choroid Plexus. *Physiological Reviews*, 93: 1847-1892.
- DE COSTER, S. & VAN LAREBEKE, N. 2012. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *J Environ Public Health*, 2012: 1-52.
- DESHPANDE, D. A., WANG, W. C. H., MCILMOYLE, E. L., ROBINETT, K. S., SCHILLINGER, R. M., AN, S. S., SHAM, J. S. K. & LIGGETT, S. B. 2010. Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction. *Nature Medicine*, 16: 1299-1304.
- EFSA. 2006. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to Bisphenol-A. *The EFSA Journal*, 428: 1-75.
- EFSA. 2015. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Executive summary. *The EFSA Journal*, 13: 1-22.

EMERICH, D. F., SKINNER, S. J. M., BORLONGAN, C. V., VASCONCELLOS, A. V. & THANOS, C. G. 2005. The choroid plexus in the rise, fall and repair of the brain. *Bioessays*, 27: 262-274.

FAAS, M. M., MELGERT, B. N. & DE VOS, P. 2010. A Brief Review on How Pregnancy and Sex Hormones Interfere with Taste and Food Intake. *Chemosensory Perception*, 3: 51-56.

FAN, R. F., ZENG, B. Y., LIU, X. S., CHEN, C., ZHUANG, Q. W., WANG, Y. J., HU, M. L., LV, Y. S., LI, J. N., ZHOU, Y. X. & LIN, Z. Y. W. 2015. Levels of bisphenol-A in different paper products in Guangzhou, China, and assessment of human exposure via dermal contact. *Environmental Science-Processes & Impacts*, 17: 667-673.

FEHR, J., MEYER, D., WIDMAYER, P., BORTH, H. C., ACKERMANN, F., WILHELM, B., GUDERMANN, T. & BOEKHOFF, I. 2007. Expression of the G-protein alpha-subunit gustducin in mammalian spermatozoa. *Journal of Comparative Physiology a-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology*, 193: 21-34.

FENICHEL, P., CHEVALIER, N. & BRUCKER-DAVIS, F. 2013. Bisphenol A: An endocrine and metabolic disruptor. *Annales D Endocrinologie*, 74: 211-220.

FLINT, S., MARKLE, T., THOMPSON, S. & WALLACE, E. 2012. Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective. *Journal of Environmental Management*, 104: 19-34.

FOSTER, S. R., PORRELLO, E. R., PURDUE, B., CHAN, H. W., VOIGT, A., FRENZEL, S., HANNAN, R. D., MORITZ, K. M., SIMMONS, D. G., MOLENAAR, P., ROURA, E., BOEHM, U., MEYERHOF, W. & THOMAS, W. G. 2013. Expression, Regulation and Putative Nutrient-Sensing Function of Taste GPCRs in the Heart. *Plos One*, 8: e64579 .

GEENS, T., GOEYENS, L. & COVACI, A. 2011. Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked? *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214: 339-347.

GEENS, T., GOEYENS, L., KANNAN, K., NEELS, H. & COVACI, A. 2012. Levels of bisphenol-A in thermal paper receipts from Belgium and estimation of human exposure. *Science of the Total Environment*, 435: 30-33.

GENTILCORE, D., PORRECA, I., RIZZO, F., GANBAATAR, E., CARCHIA, E., MALLARDO, M., DE FELICE, M. & AMBROSINO, C. 2013. Bisphenol A interferes with thyroid specific gene expression. *Toxicology*, 304: 21-31.

GHAYEE, H. K. & AUCHUS, R. J. 2007. Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 8: 289-300.

- GRUBER, C. J., TSCHUGGUEL, W., SCHNEEBERGER, C. & HUBER, J. C. 2002. Mechanisms of disease - Production and actions of estrogens. *New England Journal of Medicine*, 346: 340-352.
- HASS, N., SCHWARZENBACHER, K. & BREER, H. 2010. T1R3 is expressed in brush cells and ghrelin-producing cells of murine stomach. *Cell and Tissue Research*, 339: 493-504.
- HONG-GOKA, B. C. & CHANG, F. L. F. 2004. Estrogen receptors alpha and beta in choroid plexus epithelial cells in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 360: 113-116.
- JANG, H. J., KOKRASHVILI, Z., THEODORAKIS, M. J., CARLSON, O. D., KIM, B. J., ZHOU, J., KIM, H. H., XU, X., CHAN, S. L., JUHASZOVA, M., BERNIER, M., MOSINGER, B., MARGOLSKEE, R. F. & EGAN, J. M. 2007. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 15069-15074.
- JANICKI, S. C. & SCHUPF, N. 2010. Hormonal Influences on Cognition and Risk for Alzheimer's Disease. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 10: 359-366.
- JOHANSSON, P. A. 2014. The choroid plexuses and their impact on developmental neurogenesis. *Frontiers in Neuroscience*, 8: 1-9.
- JOHANSSON, P. A., DZIEGIELEWSKA, K. M., LIDDELOW, S. A. & SAUNDERS, N. R. 2008. The blood-CSF barrier explained: When development is not immaturity. *Bioessays*, 30: 237-248.
- KUMAR, S., LATA, K., MUKHOPADHYAY, S. & MUKHERJEE, T. K. 2010. Role of estrogen receptors in pro-oxidative and anti-oxidative actions of estrogens: A perspective. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1800: 1127-1135.
- LAFFITTE, A., NEIERS, F. & BRIAND, L. 2014. Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 17: 379-385.
- LEE, R. J., XIONG, G., KOFONOW, J. M., CHEN, B., LYSENKO, A., JIANG, P., ABRAHAM, V., DOGHRAMJI, L., ADAPPA, N. D., PALMER, J. N., KENNEDY, D. W., BEAUCHAMP, G. K., DOULIAS, P. T., ISCHIROPOULOS, H., KREINDLER, J. L., REED, D. R. & COHEN, N. A. 2012. T2R38 taste receptor polymorphisms underlie susceptibility to upper respiratory infection. *The Journal of Clinical Investigation*, 122: 4145-4159.
- LEHTINEN, M. K., BJORNSSON, C. S., DYMECKI, S. M., GILBERTSON, R. J., HOLTZMAN, D. M. & MONUKI, E. S. 2013. The Choroid Plexus and Cerebrospinal Fluid: Emerging Roles in Development, Disease, and Therapy. *Journal of Neuroscience*, 33: 17553-17559.
- LI, F. 2013. Taste perception: from the tongue to the testis. *Molecular Human Reproduction*, 19: 349-360.

- LI, F. & ZHOU, M. L. 2012. Depletion of bitter taste transduction leads to massive spermatid loss in transgenic mice. *Molecular Human Reproduction*, 18: 289-297.
- LIDDELOW, S. A. 2015. Development of the choroid plexus and blood-CSF barrier. *Frontiers in Neuroscience*, 9: 1-13.
- LIMAN, E. R., ZHANG, Y. V. & MONTELL, C. 2014. Peripheral Coding of Taste. *Neuron*, 81: 984-1000.
- LIU, X., GU, F., JIANG, L., CHEN, F. X. & LI, F. 2015. Expression of bitter taste receptor Tas2r105 in mouse kidney. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458: 733-738.
- LORBER, M., SCHECTER, A., PAEPKE, O., SHROPSHIRE, W., CHRISTENSEN, K. & BIRNBAUM, L. 2015. Exposure assessment of adult intake of bisphenol A (BPA) with emphasis on canned food dietary exposures. *Environment International*, 77: 55-62.
- LU, S. Y., CHANG, W. J., SOJINU, S. O. & NI, H. G. 2013. Bisphenol A in supermarket receipts and its exposure to human in Shenzhen, China. *Chemosphere*, 92: 1190-1194.
- LUN, M. P., MONUKI, E. S. & LEHTINEN, M. K. 2015. Development and functions of the choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Nature Reviews Neuroscience*, 16: 445-457.
- MACLUSKY, N. J., HAJSZAN, T. & LERANTH, C. 2005. The environmental estrogen bisphenol a inhibits estradiol-induced hippocampal synaptogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 113: 675-679.
- MEEKER, J. D. 2012. Exposure to Environmental Endocrine Disruptors and Child Development. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 166: 952-958.
- MELLON, S. H. & GRIFFIN, L. D. 2002. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 13: 35-43.
- MELLON, S. H., GRIFFIN, L. D. & COMPAGNONE, N. A. 2001. Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Research Reviews*, 37: 3-12.
- MENNELLA, J. A., SPECTOR, A. C., REED, D. R. & COLDWELL, S. E. 2013. The Bad Taste of Medicines: Overview of Basic Research on Bitter Taste. *Clinical Therapeutics*, 35: 1225-1246.
- MEYER, D., VOIGT, A., WIDMAYER, P., BORTH, H., HUEBNER, S., BREIT, A., MARSCHALL, S., DE ANGELIS, M. H., BOEHM, U., MEYERHOF, W., GUDERMANN, T. & BOEKHOFF, I. 2012. Expression of Tas1 Taste Receptors in Mammalian Spermatozoa: Functional Role of Tas1r1 in Regulating Basal Ca²⁺ and cAMP Concentrations in Spermatozoa. *Plos One*, 7: e32354.

MICEVYCH, P. & DOMINGUEZ, R. 2009. Membrane estradiol signaling in the brain. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30: 315-327.

MIKOLAJEWSKA, K., STRAGIEROWICZ, J. & GROMADZINSKA, J. 2015. Bisphenol a - Application, Sources of Exposure and Potential Risks in Infants, Children and Pregnant Women. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 28: 209-241.

MILEVA, G., BAKER, S. L., KONKLE, A. T. M. & BIELAJEW, C. 2014. Bisphenol-A: Epigenetic Reprogramming and Effects on Reproduction and Behavior. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11: 7537-7561.

MILLAS, I. & LIQUIDATO, B. M. 2009. Estrogen receptors alpha and beta in non-target organs for hormone action: review of the literature *Brazilian Journal of morphological Sciences* 26: 193-197.

MILLER, W. L. & AUCHUS, R. J. 2011. The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Endocrine Reviews*, 32: 81-151.

MIYATAKE, M., MIYAGAWA, K., MIZUO, K., NARITA, M. & SUZUKI, T. 2006. Dynamic changes in dopaminergic neurotransmission induced by a low concentration of bisphenol-A in neurones and astrocytes. *Journal of Neuroendocrinology*, 18: 434-444.

MORTAZAVI, M. M., GRIESSENAUER, C. J., ADEEB, N., DEEP, A., SHAHRIPOUR, R. B., LOUKAS, M., TUBBS, R. I. & TUBBS, R. S. 2014. The choroid plexus: a comprehensive review of its history, anatomy, function, histology, embryology, and surgical considerations. *Childs Nervous System*, 30: 205-214.

MOSINGER, B., REDDING, K. M., PARKER, M. R., YEVSHAYEVA, V., YEE, K. K., DYOMINA, K., LI, Y. & MARGOLSKEE, R. F. 2013. Genetic loss or pharmacological blockade of testes-expressed taste genes causes male sterility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110: 12319-12324.

NAKAGAWA, Y., NAGASAWA, M., YAMADA, S., HARA, A., MOGAMI, H., NIKOLAEV, V. O., LOHSE, M. J., SHIGEMURA, N., NINOMIYA, Y. & KOJIMA, I. 2009. Sweet Taste Receptor Expressed in Pancreatic beta-Cells Activates the Calcium and Cyclic AMP Signaling Systems and Stimulates Insulin Secretion. *Plos One*, 4: e5106.

NIKI, M., YOSHIDA, R., TAKAI, S. & NINOMIYA, Y. 2010. Gustatory Signaling in the Periphery: Detection, Transmission, and Modulation of Taste Information. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 33: 1772-1777.

OLDE, B. & LEEB-LUNDBERG, L. M. F. 2009. GPR30/GPER1: searching for a role in estrogen physiology. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 20: 409-416.

OSBORNE, C. K. & SCHIFF, R. 2005. Estrogen-receptor biology: Continuing progress and therapeutic implications. *Journal of Clinical Oncology*, 23: 1616-1622.

OYA, M., SUZUKI, H., WATANABE, Y., SATO, M. & TSUBOI, T. 2011. Amino acid taste receptor regulates insulin secretion in pancreatic beta-cell line MIN6 cells. *Genes to Cells*, 16: 608-616.

PFAFFL, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29: 2002-2007.

PROSSNITZ, E. R. & BARTON, M. 2011. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 7: 715-726.

PROSSNITZ, E. R., OPREA, T. I., SKLAR, L. A. & ARTERBURN, J. B. 2008. The ins and outs of GPR30: A transmembrane estrogen receptor. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 109: 350-353.

QUINTELA, T., GONCALVES, I., BALTAZAR, G., ALVES, C. H., SARAIVA, M. J. & SANTOS, C. R. A. 2009. 17 beta-Estradiol Induces Transthyretin Expression in Murine Choroid Plexus via an Oestrogen Receptor Dependent Pathway. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 29: 475-483.

QUINTELA, T., GONCALVES, I., CARRETO, L. C., SANTOS, M. A. S., MARCELINO, H., PATRIARCA, F. M. & SANTOS, C. R. A. 2013. Analysis of the Effects of Sex Hormone Background on the Rat Choroid Plexus Transcriptome by cDNA Microarrays. *Plos One*, 8: e60199.

QUINTELA, T., GONCALVES, I., MARTINHO, A., ALVES, C. H., SARAIVA, M. J., ROCHA, P. & SANTOS, C. R. A. 2011. Progesterone Enhances Transthyretin Expression in the Rat Choroid Plexus In Vitro and In Vivo via Progesterone Receptor. *Journal of Molecular Neuroscience*, 44: 152-158.

REDZIC, Z. B. & SEGAL, M. B. 2004. The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56: 1695-1716.

REN, X., ZHOU, L., TERWILLIGER, R., NEWTON, S. S. & DE ARAUJO, I. E. 2009. Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 3: 1-15.

RESNIK, D. B. & ELLIOTT, K. C. 2015. Bisphenol a and Risk Management Ethics. *Bioethics*, 29: 182-189.

REZG, R., EL-FAZAA, S., GHARBI, N. & MORNAGUI, B. 2014. Bisphenol A and human chronic diseases: Current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environment International*, 64: 83-90.

- ROCHESTER, J. R. 2013. Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reproductive Toxicology*, 42: 132-155.
- ROGERS, J. A., METZ, L. & YONG, V. W. 2013. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: A focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Molecular Immunology*, 53: 421-430.
- ROPER, S. D. 2007. Signal transduction and information processing in mammalian taste buds. *European Journal of Physiology*, 454: 759-776.
- RUBIN, B. S. 2011. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127: 27-34.
- SANDERSON, J. T. 2006. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicological Sciences*, 94: 3-21.
- SHAH, A. S., BEN-SHAHAR, Y., MONINGER, T. O., KLINE, J. N. & WELSH, M. J. 2009. Motile Cilia of Human Airway Epithelia Are Chemosensory. *Science*, 325: 1131-1134.
- SHANLE, E. K. & XU, W. 2011. Endocrine Disrupting Chemicals Targeting Estrogen Receptor Signaling: Identification and Mechanisms of Action. *Chemical Research in Toxicology*, 24: 6-19.
- SILVA, E., KABIL, A. & KORTENKAMP, A. 2010. Cross-talk between non-genomic and genomic signalling pathways - Distinct effect profiles of environmental estrogens. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 245: 160-170.
- SINGH, N., VRONTAKIS, M., PARKINSON, F. & CHELIKANI, P. 2011. Functional bitter taste receptors are expressed in brain cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 406: 146-151.
- SKIPOR, J. & THIERY, J. C. 2008. The choroid plexus - cerebrospinal fluid system: Undervaluated pathway of neuroendocrine signaling into the brain. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 68: 414-428.
- SMITH, D. E., JOHANSON, C. E. & KEEP, R. F. 2004. Peptide and peptide analog transport systems at the blood-CSF barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56: 1765-1791.
- STEINERT, R. E., GERSPACH, A. C., GUTMANN, H., ASARIAN, L., DREWE, J. & BEGLINGER, C. 2011. The functional involvement of gut-expressed sweet taste receptors in glucose-stimulated secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and peptide YY (PYY). *Clinical Nutrition*, 30: 524-532.
- SUGITA, M. 2006. Taste perception and coding in the periphery. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63: 2000-2015.

- SUN, Y., NAKASHIMA, M. N., TAKAHASHI, M., KURODA, N. & NAKASHIMA, K. 2002. Determination of bisphenol A in rat brain by microdialysis and column switching high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Biomedical Chromatography*, 16: 319-326.
- TANG, Y. P., HASLAM, S. Z., CONRAD, S. E. & SISK, C. L. 2004. Estrogen increases brain expression of the mRNA encoding transthyretin, an amyloid beta scavenger protein. *Journal of Alzheimer's Disease*, 6: 413-20.
- TIZZANO, M., CRISTOFOLETTI, M., SBARBATI, A. & FINGER, T. E. 2011. Expression of taste receptors in Solitary Chemosensory Cells of rodent airways. *Bmc Pulmonary Medicine*, 11: 1-12.
- TSAI, L. C. L. & BEAVO, J. A. 2011. The roles of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) in steroidogenesis. *Current Opinion in Pharmacology*, 11: 670-675.
- VANDENBERG, L. N., CHAHOUD, I., HEINDEL, J. J., PADMANABHAN, V., PAUMGARTTEN, F. J. R. & SCHOENFELDER, G. 2010. Urinary, Circulating, and Tissue Biomonitoring Studies Indicate Widespread Exposure to Bisphenol A. *Environmental Health Perspectives*, 118: 1055-1070.
- VANDENBERG, L. N., HAUSER, R., MARCUS, M., OLEA, N. & WELSHONS, W. V. 2007. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*, 24: 139-77.
- VANDENBERG, L. N., HUNT, P. A., MYERS, J. P. & VOM SAAL, F. S. 2013. Human exposures to bisphenol A: mismatches between data and assumptions. *Reviews on Environmental Health*, 28: 37-58.
- WELCOME, M. O., MASTORAKIS, N. E. & PEREVERZEV, V. A. 2015. Sweet taste receptor signaling network: possible implication for cognitive functioning. *Neurology Research International*, 2015: 1-13.
- WELSHONS, W. V., NAGEL, S. C. & VOM SAAL, F. S. 2006. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*, 147: S56-S69.
- WETHERILL, Y. B., AKINGBEMI, B. T., KANNO, J., MCLACHLAN, J. A., NADAL, A., SONNENSCHNEING, C., WATSON, C. S., ZOELLER, R. T. & BELCHER, S. M. 2007. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive Toxicology*, 24: 178-198.
- WOJTAL, K., TROJNAR, M. K. & CZUCZWAR, S. J. 2006. Endogenous neuroprotective factors: neurosteroids. *Pharmacological Reports*, 58: 335-340.
- WOLBURG, H. & PAULUS, W. 2010. Choroid plexus: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119: 75-88.

WÖLFLE, U., ELSHOLZ, F. A., KERSTEN, A., HAARHAUS, B., MULLER, W. E. & SCHEMPP, C. M. 2015. Expression and Functional Activity of the Bitter Taste Receptors TAS2R1 and TAS2R38 in Human Keratinocytes. *Skin Pharmacology and Physiology*, 28: 137-146.

WU, S. V., ROZENGURT, N., YANG, M., YOUNG, S. H., SINNETT-SMITH, J. & ROZENGURT, E. 2002. Expression of bitter taste receptors of the T2R family in the gastrointestinal tract and enteroendocrine STC-1 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 2392-2397.

XU, J., CAO, J., IGUCHI, N., RIETHMACHER, D. & HUANG, L. Q. 2013. Functional characterization of bitter-taste receptors expressed in mammalian testis. *Molecular Human Reproduction*, 19: 17-28.

YAMAMOTO, K. & ISHIMARU, Y. 2013. Oral and extra-oral taste perception. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 24: 240-246.

YOON, K., KWACK, S. J., KIM, H. S. & LEE, B. M. 2014. Estrogenic endocrine-disrupting chemicals: molecular mechanisms of actions on putative human diseases. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 17: 127-74.

ZAPPATERRA, M. W. & LEHTINEN, M. K. 2012. The cerebrospinal fluid: regulator of neurogenesis, behavior, and beyond. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69: 2863-2878.

ZHANG, Z. F., ALOMIRAH, H., CHO, H. S., LI, Y. F., LIAO, C. Y., MINH, T. B., MOHD, M. A., NAKATA, H., REN, N. Q. & KANNAN, K. 2011. Urinary Bisphenol A Concentrations and Their Implications for Human Exposure in Several Asian Countries. *Environmental Science & Technology*, 45: 7044-7050.